

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM

Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6: <p>C07K 14/00, 5/062, A61K 38/16, G01N 33/68 9/00 PNA</p>		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/42735  (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 1. Oktober 1998 (01.10.98)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/01723  (22) Internationales Anmeldedatum: 24. März 1998 (24.03.98)		(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, CN, IL, JP, KR, NO, NZ, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(30) Prioritätsdaten: 197 12 530.1 25. März 1997 (25.03.97) DE		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BOEHRINGER MANNHEIM GMBH [DE/DE]; Sandhofer Strasse 112 – 132, D-68305 Mannheim (DE).			
(72) Erfinder: und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BERGMANN, Frank [DE/DE]; Faltergatter 5, D-82393 Iffeldorf (DE). HERMANN, Rupert [DE/DE]; In der Au 23, D-82362 Weilheim (DE). SEIDEL, Christoph [DE/DE]; Ammerstrasse 39, D-82362 Weilheim (DE). KOCH, Troels [DK/DK]; Funkiavej 47, DK-2300 Kopenhagen S. (DK).			
(74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9, D-81679 München (DE).			

(54) Title: NOVEL MONOMER ELEMENTS FOR MARKING PEPTIDIC NUCLEIC ACIDS

(54) Bezeichnung: NEUE MONOMERBAUSTEINE ZUR MARKIERUNG VON PEPTIDISCHEN NUKLEINSÄUREN

(57) Abstract

The invention relates to novel monomers elements for marking peptidic nucleic acids and similarly structured nucleic acid-binding oligomers with groups which are coupled to a nucleo-base or/and the peptide backbone of the peptidic nucleic acid. The invention further relates to peptidic nucleic acids containing at least one marked monomer element.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft neue Monomerbausteine zur Markierung peptidischer Nukleinsäuren und ähnlich aufgebauter Nukleinsäure-bindender Oligomere mit Gruppen, die an eine Nukleobase oder/und an das Peptidrückgrat der peptidischen Nukleinsäure gekoppelt sind. Weiterhin betrifft die Erfindung peptidische Nukleinsäuren, die mindestens einen markierten monomeren Baustein enthalten.

**LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Amenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolci	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauritanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CN	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		

- 1 -

## Neue Monomerbausteine zur Markierung von peptidischen Nuklein-säuren

5

### Beschreibung

Die Erfindung betrifft neue Monomerbausteine zur Markierung peptidischer Nukleinsäuren und ähnlich aufgebauter Nuklein-säure-bindender Oligomere mit Gruppen, die an eine Nukleobase 10 oder/und an das Peptidrückgrat der peptidischen Nukleinsäure gekoppelt sind. Weiterhin betrifft die Erfindung peptidische Nukleinsäuren, die mindestens einen markierten monomeren Bau-stein enthalten.

15 Die chemische Einführung von Markierungsgruppen, z. B. Reportermolekülen in Nukleinsäuren ist für viele Anwendungen von großer Bedeutung. Voraussetzung ist hier der gezielte Einbau von kopplungsfähigen Gruppen, z. B. Aminogruppen, in die Nukleinsäure. Dazu werden speziell modifizierte monomere Nukleo-  
20 tidbausteine hergestellt, die zu der anschließend angewandten Nukleinsäuresynthesestrategie kompatibel sind. So werden in der Nukleinsäurechemie z. B. Trifluoracetyl- oder Fmoc-ge-  
schützte Aminoalkyloxy-Phosphoramidite für eine 5'-Endmarkie-  
rung verwendet (vgl. z. B. EP-A-224 578, Coull et al., Tetra-  
25 hedron Lett. 27 (1986), 3991 - 3994). Für Markierungen inner-  
halb eines Nukleinsäuremoleküls wurden Phosphoramidite ver-  
wendet, die eine Trifluoracetyl- oder Fmoc-geschützte Amino-  
säuregruppe und einen DMTr-Ether enthalten, wobei die Grund-  
körper nichtnukleotidischer Natur (EP-A-0 313 219, Nelson et  
30 al., Nucleic Acids Res. 17 (1989, 7179-7186) oder nukleotidi-  
scher Natur (Ruth, DNA 4 (1985), 93, WO 84/03285) sein können.  
Im Falle eines nukleotidischen Grundkörpers kommen für die  
Kopplung von Reportermolekülen bestimmte Positionen der Nu-  
kleobase bzw. des Zuckers in Frage (vgl. z. B. Ruth (1991)  
35 Oligodeoxynucleotides with reporter groups attached to the  
base, in: Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach  
(F. Eckstein, HRSG), Oxford University Press, Oxford, UK, pp.

- 2 -

255 - 282 und Manoharan et al., Tetrahedron Lett. 36 (1995),  
3647 - 3650).

Entsprechende an der Nukleobase oder an der Ribose modifizierte Nukleosidtriphosphate zum enzymatischen Aufbau einer Nukleinsäure sind ebenfalls bekannt (EP-A-0063 879, EP-A-0286 898).

Die funktionellen, zur Kopplung von Reportermolekülen fähigen Gruppen können durch eine geeignete Schutzgruppe blockiert sein, so daß die Kopplung der Reportergruppe erst nach einer Schutzgruppenentfernung der synthetisierten Nukleinsäure durch ein sogenanntes "Postlabeling" durchgeführt werden kann. Ein Reportermolekül kann aber auch direkt an die funktionelle Gruppe angekoppelt sein, sofern es unter den bei der Nukleinsäuresynthese und der Schutzgruppenentfernung herrschenden Bedingungen stabil ist. Eine zur Kopplung von Reportermolekülen fähige Aminoseitengruppe kann im übrigen auch an internukleotidischen Phosphatgruppen eingeführt werden, indem die erhaltenen Oligonukleotidphosphitester oder H-Phosphonat mit einem monogeschützten Diamin zum entsprechenden Phosphoramidat oxidiert werden (WO 92/08728 und Agrawal et al., Nucleic Acids Res. 18 (1990), 5419).

Bei Hybridisierung von Nukleinsäuren, die innerhalb des Stranges mit Reportermolekülen gekoppelt sind, wird im allgemeinen eine Erniedrigung der Schmelztemperatur  $T_m$  nach Anhybridisierung eines komplementären Nukleinsäuregegenstrangs gefunden. Diese Erniedrigung der Schmelztemperatur kann in manchen Fällen zu Problemen für die Spezifität und Sensitivität von Nukleinsäure-Hybridisierungsverfahren führen.

Durch die erhöhte Affinität und Selektivität in der Basenpaarung zu einem komplementären Nukleinsäuregegenstrang im Vergleich zu üblichen Nukleinsäuren gewinnen peptidische Nukleinsäuren (PNA) eine immer größere Bedeutung bei der Durchführung von Hybridisierungsreaktionen (Egholm et al., J. Am. Chem.

- 3 -

Soc. 114 (1992), 1895 - 1897, WO92/20 702 und WO 92/20 703). Bei den PNA ist das Zuckerphosphat-Rückgrat der Nukleinsäuren durch ein peptidisches Rückgrat, z. B. ein 2-Aminoethylglycin-Rückgrat ersetzt. Die Nukleobasen sind am zentralen Stickstoffatom z. B. über eine Methylencarbonylgruppe angekoppelt. Die Synthese einer PNA unterscheidet sich daher wesentlich von der DNA-Synthese, da andere Schutzgruppen und Kopplungschemien erforderlich sind. Das Einbringen von funktionellen Gruppen für weitere Derivatisierungen, z. B. zur Einführung von Reportermolekülen, erfolgte bisher am N-Terminus des letzten PNA-Bausteins direkt oder nach weiteren Ankoppeln einer oder mehrerer  $\omega$ -Aminosäuren. Auch durch Einbau von Lysinresten am C- und am N-Terminus war eine terminale Einführung von funktionalisierbaren Gruppen möglich.

15

Da durch diese terminale Markierung nur eine begrenzte Anzahl von Reportermolekülen in PNA eingeführt werden kann, besteht ein großes Bedürfnis nach alternativen Methoden zur Einführung von Markierungsgruppen in PNA.

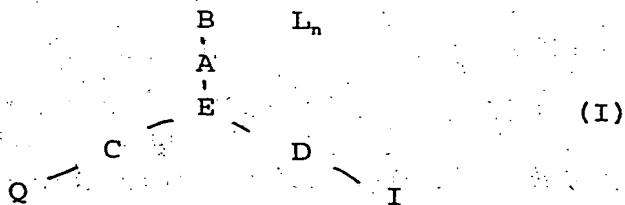
20

Diese Aufgabe wird durch die vorliegende Erfindung dadurch gelöst, daß neue Monomerbausteine für die PNA-Synthese bereitgestellt werden, die die Einführung von Markierungsgruppen innerhalb des Stranges von PNA-Molekülen erlauben, wobei die 25 Markierungsgruppe an eine Nukleobase und/oder an ein Peptidrückgrat gekoppelt wird.

Überraschenderweise wurde dabei festgestellt, daß bei Markierung von PNA an Nukleobasen und am Peptidrückgrat ein Anstieg 30 der Schmelztemperatur von Hybriden mit einer Nukleinsäure gegenüber Hybriden mit nichtmarkierten PNA-Strängen auftritt oder zumindest eine schwächere Destabilisierung als bei einem entsprechenden DNA-DNA-Hybrid mit einem markierten DNA-Strang auftritt. Diese überraschende Schmelzpunkt erhöhung führt bei 35 Hybridisierungsreaktionen zu einer erhöhten Spezifität und erlaubt in Nachweisverfahren die Verwendung stringenterer Waschbedingungen und/oder kürzerer Sonden.

- 4 -

Eine erste Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft monomere Bausteine zur Synthese von Nukleinsäure-bindenden peptidischen Oligomeren, die eine Markierungsgruppe oder eine zur Kopplung mit einer Markierungsgruppe fähige Gruppe an der Nukleobase tragen. Derartige Monomere werden vorzugsweise durch Verbindungen der Formel (I) dargestellt:



worin:

- 15      B      eine natürliche oder nichtnatürlich Nukleobase ist, die gegebenenfalls eine Schutzgruppe trägt,
- L      eine Markierungsgruppe vorzugsweise ausgewählt aus signalgebenden Gruppen, Intercalatoren und pharmazeutisch wirksamen Gruppen oder eine zur Kopplung mit einer Markierungsgruppe fähige Gruppe ist, die gegebenenfalls eine Schutzgruppe trägt,
- 20      A, C, D    jeweils unabhängig voneinander chemische Bindungen oder organische Reste darstellen,
- E      eine Gruppe ausgewählt aus N, R<sup>1</sup>N' oder CH ist, wobei R<sup>1</sup> ein organischer Rest oder Wasserstoff ist,
- 25      Q      eine Gruppe NR<sup>2</sup>Y ist, wobei R<sup>2</sup> ein organischer Rest oder Wasserstoff ist, und Y eine Schutzgruppe oder ein Träger ist,
- I      eine Gruppe ausgewählt aus COX, CSX, SOX oder SO<sub>2</sub>X ist, wobei X OH, SH, OM, SM oder eine Schutzgruppe ist und M ein Kation, vorzugsweise ein Metall- oder Ammoniumkation ist und
- 30      n      eine ganze Zahl von 1 bis 3, vorzugsweise 1 ist.

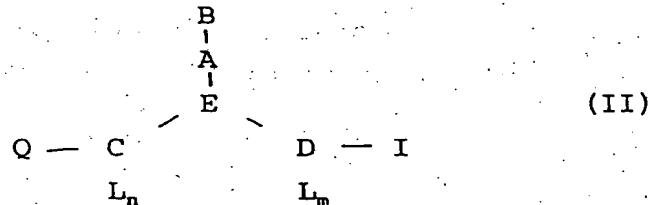
- 5 -

A, C und D sind vorzugsweise  $C_1-C_{10}$ -Alkylen-, Alkenylen- oder Alkinylenereste, die gegebenenfalls Heteroatome wie O, N, P oder Halogen oder/und Substituenten tragen können.

s A ist besonders bevorzugt ein  $-(CH_2)_l-CO$ -Rest, wobei l eine ganze Zahl von 0 bis 5 ist. Am meisten bevorzugt ist A ein  $-CH_2CO$ -Rest. C ist besonders bevorzugt  $-(CH_2)_k-CHR'$ -Rest, wobei k eine ganze Zahl von 0 bis 5 ist und R' Wasserstoff oder die Seitenkette einer natürlich vorkommenden Aminosäure ist. Am meisten bevorzugt ist C ein  $-(CH_2)_2$ -Rest. D ist besonders bevorzugt ein  $(CH_2)_m-CHR''$ -Rest, wobei m eine ganze Zahl von 0 bis 5 ist und R Wasserstoff oder die Seitenkette einer natürlich vorkommenden Aminosäure ist. Am meisten bevorzugt ist D ein  $-CH_2$ -Rest. Alternativ können A und B oder A und D auch miteinander verbrückt sein, d. h. eine gemeinsame Ringstruktur ausbilden.

In einem weiterem Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung monomere Bausteine zur Synthese von Nucleinsäure-bindenden peptidischen Oligomeren, die mindestens eine signalgebende Gruppe am Peptidrückgrad enthalten. Vorzugsweise sind diese Monomerbausteine Verbindungen der Formel (II):

25



30 worin:

B, A, C, D, E, Q und I wie für die Verbindungen (I) definiert sind,

35 L eine Markierungsgruppe vorzugsweise ausgewählt aus signalgebenden Gruppen, Intercalatoren und pharmazeutisch wirksamen Gruppen ist

- 6 -

und n und m 0 oder 1 bis 3 sind, mit der Maßgabe, daß die Summe von n + m nicht 0 ist. Vorzugsweise sind n und m 0 oder 1.

s Bei den Verbindungen der Formel (II) ist die Gruppe L vorzugsweise ein Substituent von D. Besonders bevorzugt ist D eine Gruppe -CH(R'-L), wobei R' ein organischer Rest wie zuvor definiert ist. Am meisten bevorzugt ist R' der Rest der Seitenkette einer natürlich vorkommenden Aminosäure oder der entsprechenden enantiomeren Verbindung, z. B. Lysin. Das asymmetrische C-Atom der Gruppe -C'H(R'-L) weist vorzugsweise die D-Konfiguration auf.

Die Nukleobase der Verbindungen (I) und (II) ist eine beliebige natürliche oder nichtnatürliche Nukleobase, wobei grundsätzlich alle Nukleobasen geeignet sind, die zur Hybridisierung mit einer komplementären natürlichen Nukleobase auf einem DNA- oder RNA-Molekül in der Lage sind. Vorzugsweise ist die Nukleobase B ausgewählt aus Thymin, Uracil, Cytosin, Adenin, Guanin, Hypoxanthin, Purin, 7-Deazapurin, 2,4-Diaminopurin, 2,6-Diaminopurin, 7-Deazaguanin, Pseudouracil, Pseudocytosin, Pseudoisocytosin, N<sup>4</sup>,N<sup>4</sup>-Ethanocytosin, N<sup>6</sup>,N<sup>6</sup>-Ethano-2,6-diaminopurin, 5-(C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkinylcytosin, 5-Fluoruracil oder 2-Hydroxy-5-methyl-4-triazolopyrimidin, wobei die Nukleobase gegebenenfalls eine Schutzgruppe trägt.

Da im Stand der Technik zahlreiche Varianten für die Grundstruktur von PNA-Monomeren bekannt sind, können die Reste A, C, D, E, Q und I eine Vielzahl bekannter Bedeutungen annehmen. Insbesondere wird hinsichtlich der Bedeutung dieser Reste auf die Dokumente WO 92/20 702, WO 92/20 703, DE-A-43 31 012, DE-A-44 08 531, DE-A-44 08 533, DE-A-44 25 311 und EP-A-0 739 898 verwiesen. Die relevanten Passagen dieser Dokumente betreffend die Bedeutung der o. g. Reste werden durch die Bezugnahme zum Teil der vorliegenden Beschreibung.

- 7 -

Die Nukleobase B trägt vorzugsweise eine oder mehrere Schutzgruppen, insbesondere an exozyklischen Aminofunktionen.

Eine Schutzgruppe gemäß vorliegender Erfindung ist eine chemische Gruppe, die verhindert, daß die funktionelle Gruppe, an die sie gebunden ist, an einer chemischen Reaktion teilnimmt, die nicht erwünscht ist. Die Schutzgruppe kann von dieser funktionellen Gruppe entfernt werden, ohne sie zu zerstören.

Beispiele für geeignete Schutzgruppen sind basenlabile Schutzgruppen wie z. B. 9-Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc), 2,2-[Bis(4-nitrophenyl)]-ethoxycarbonyl (Bnpeoc), 2-(2,4-Dinitrophenyl)-ethoxycarbonyl (Dnpeoc), 2-(4-Nitrophenyl)-ethyloxy-carbonyl, 1-(4,4-Dimethyl-2,6-dioxocyclohexyliden)ethyl (Dde) und 2-Methylsulfonylethyloxy carbonyl (Msc). Von diesen Schutzgruppen besonders bevorzugt ist Fmoc. Weiterhin sind auch säurelabile Schutzgruppen vom Urethantyp wie tert-Butyloxycarbonyl (Boc), 4-Methoxybenzyloxy-carbonyl (Moz) oder vom Triptyltyp wie Triphenylmethyl (Trt), (4-Methoxyphenyl)diphenyl-methyl (Mmt), (4-Methylphenyl)diphenylmethyl (Mtt), Di-(4-methoxyphenyl)phenylmethyl (Dmt) geeignet. Besonders bevorzugt von diesen Schutzgruppen sind Boc, Trt, Mmt, Mtt und Dmt. Schließlich sind auch Schutzgruppen vom Acyltyp wie Benzoyl-(Z), Isobutyryl-, Acetyl-, Phenoxyacetyl-, 4-(t-Butyl)benzoyl, 4-(t-Butyl)-phenoxyacetyl-4-(methoxy) benzoyl geeignet. Zweckmäßigerweise werden solche Schutzgruppen verwendet, die mit der beabsichtigten Oligomersynthesestrategie kompatibel sind.

Bei Verbindungen der Formel (I) ist die Gruppe L an die Nukleobase B gekoppelt. Bevorzugte Kopplungspositionen sind wie folgt: Wenn es sich bei der Nukleobase um eine Pyrimidinbase (C, T, U oder ein nichtnatürliche Derivat davon) handelt, kann die Gruppe L vorzugsweise an die C-5 Position gebunden sein. Wenn es sich bei der Nukleobase um ein Cytosin oder ein Derivat davon handelt, kann die Gruppe L vorzugsweise an die N-4 Position gebunden sein. Wenn es sich bei der Nukleobase um eine Purinbase (A, G oder ein Derivat davon) handelt, kann die

- 8 -

Gruppe L vorzugsweise an die C-8 Position gebunden sein. Wenn es sich bei der Nukleobase um Adenin oder um ein Derivat davon handelt, kann die Gruppe L vorzugsweise an die N-6 Position gebunden sein. Wenn es sich bei der Nukleobase um eine Purinbase handelt, kann die Gruppe L vorzugsweise an die N-2 Position gebunden sein. Wenn es sich um der Nukleobase um ein 7-Deazapurin handelt, kann die Gruppe L vorzugsweise an die C-7 Position gebunden sein. Besonders bevorzugt ist die Nukleobase eine Pyrimidinbase und die Gruppe L ist an die C-5 Position gebunden.

Die Gruppe L ist eine Gruppe vorzugsweise ausgewählt aus signalgebenden Gruppen, Intercalatoren und pharmazeutisch wirksamen Gruppen oder eine zur Kopplung mit einer der vor 15 genannten Gruppen fähige Gruppe. Die Gruppe L kann eine oder mehrere Schutzgruppen tragen, sofern dies erforderlich ist, um unerwünschte Reaktionen bei den während der PNA-Synthese herrschenden Bedingungen zu verhindern. Die Gruppe L ist vorzugsweise an die Nukleobase B über eine Bindung gekoppelt, die 20 unter Bedingungen stabil ist, bei denen die für die jeweilige Synthesestrategie verwendeten intermediären Schutzgruppen abgespalten werden. Insbesondere ist L bevorzugt nicht eine direkt durch eine basenlabile Schutzgruppe geschützte exocyclische Aminofunktion. Unter einer exocyclischen Aminofunktion 25 wird in der vorliegenden Erfindung eine direkt (d.h. nicht über einen Linker) am Heterocyclus sitzende Aminofunktion verstanden.

Vorzugsweise ist die Gruppe L eine signalgebende Gruppe oder 30 ein Reportermolekül. Hierfür geeignet sind alle bisher bekannten signalgebende Gruppen für Polypeptide und Nukleotide, insbesondere nichtradioaktive signalgebende Gruppen. Beispiele für solche Gruppen sind Chromogene (fluoreszierende oder lumineszierende Gruppen, Farbstoffe), Enzyme, NMR-aktive Gruppen 35 oder Metallpartikel, Haptene, z. B. Digoxigenin, oder Biotin und Derivate davon, die mit Streptavidin oder Avidin bindefähig sind. Weiterhin kann die Markierungsgruppe auch eine pho-

- 9 -

toaktivierbare Quervernetzungsgruppe sein, z. B. eine Azido- oder Aziringruppe. Besonders bevorzugte signalgebende Gruppen sind durch Elektrochemolumineszenz nachweisbare Metallchelate, besonders bevorzugt Rutheniumchelate, z. B. ein Ruthenium-<sup>s</sup> (bipyridyl)<sub>2</sub><sup>+</sup>Chelat. Geeignete Ruthenium-Markierungsgruppen sind beispielsweise in EP-A-0580 979, WO 90/053 01, WO 90/11 511 und WO 92/14 138 beschrieben. Diese Dokumente werden aufgrund der Bezugnahme Bestandteil der vorliegenden Beschreibung.

10.

Weiterhin kann die Gruppe L auch ein Intercalator sein, der sich in ein PNA-Nukleinsäurehybrid einlagern kann und auf diese Weise gegebenenfalls dessen Nachweis ermöglicht. Geeignete Intercalatoren sind z. B. Thiazolorange, Ethidiumbromid 15 oder Propidiumiodid.

Weiterhin kann die Gruppe L eine pharmazeutisch wirksame Gruppe sein, z. B. eine RNA-spaltende Gruppe, wie etwa ein Imidazol enthaltender Rest (vgl. WO 93/17 7117, DE-A-44 25 20 311, WO 96/07 667) oder eine Gruppe, welche die pharmakodynamischen oder pharmakokinetischen Eigenschaften verbessern kann (WO94/068 15). Diese Dokumente werden durch Bezugnahme zum Teil der vorliegenden Beschreibung.

25 Bei den Verbindungen der Formel (I) und (II) können Markierungsgruppen bereits vor der Synthese der Nukleinsäure-bindenden Oligomere in den Monomerbaustein eingeführt werden, sofern sie mit den bei der jeweiligen Synthesestrategie herrschenden Bedingungen kompatibel sind. Die Kompatibilität kann gegebenenfalls durch Einfügung entsprechender Gruppen an funktionellen Schutzgruppen wie etwa Amino- oder OH-Gruppen der Markierungsgruppen erreicht oder/und verbessert werden. Beispiele für geeignete Gruppen, die während der Oligomersynthese stabil sind, sind lumineszierende Metallchelate wie etwa Ruthenium-<sup>s</sup> (bipyridyl)<sub>2</sub>, Biotin oder Fluorescein.

- 10 -

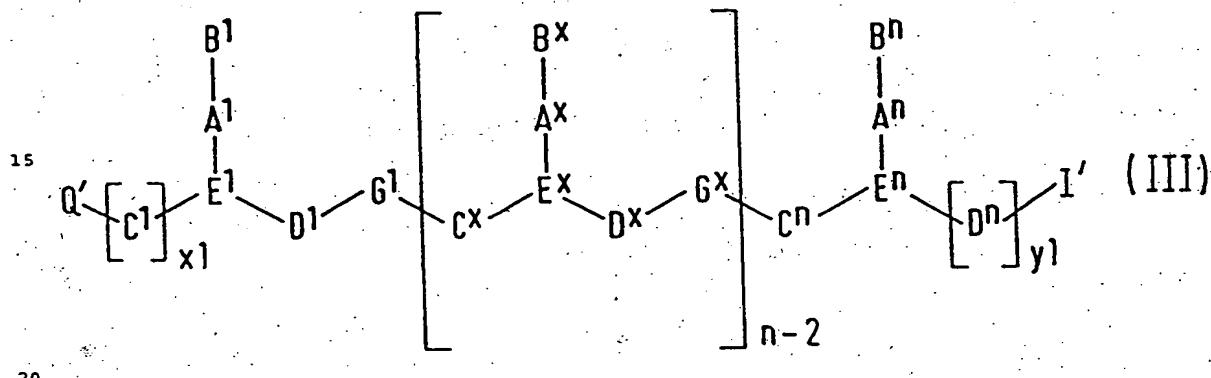
Andererseits kann die Gruppe L auch ein Rest sein, der zur Kopplung mit einer Markierungsgruppe fähig ist. Beispiele für geeignete Reste sind reaktive Gruppen wie etwa Aminogruppen oder Aktivester, die vorzugsweise über geeignete Linker mit der Nukleobase oder dem Peptid-Rückgrat verbunden sind. Bei Verbindungen der Formel (I) weist L in diesem Fall vorzugsweise die Struktur -R'-NHY auf wobei R' ein C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> Alkylen-, Alkenylen- oder Alkinylenrest ist, der gegebenenfalls Heteroatome enthält und Y eine Schutzgruppe ist. Besonders bevorzugt ist R' eine -CH=CH-CH<sub>2</sub>-Gruppe.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen der Formeln (I) und (II) können als monomere Bausteine bei der Synthese von Nukleinsäure-bindenden peptidischen Oligomeren eingesetzt werden. Nukleinsäure-bindende peptidische Oligomere sind aus mehreren monomeren Bausteinen zusammengesetzte Verbindungen, wobei die Verknüpfung der Bausteine zumindest teilweise über peptidische Bindungen oder andere Säureamidbindungen (z. B. CONH, CONR<sup>2</sup>, CSNH, CSNR<sup>2</sup>, SONH, SONR<sup>2</sup>, SO<sub>2</sub>NH oder SO<sub>2</sub>NR<sup>2</sup>, wobei R<sup>2</sup> wie zuvor definiert ist) erfolgt. Diese Oligomere können außerdem an Nukleinsäuren über eine Basenpaarung binden. Eine solche Basenpaarung erfolgt üblicherweise durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen komplementären Nukleobasen. Nukleinsäure-bindende Oligomere können an Nukleinsäuren grundsätzlich auf zwei Arten binden. Im ersten Fall bindet ein Strang des Nukleinsäure-bindenden Oligomers an eine ausgewählte Region einer einzelsträngigen Nukleinsäure, wobei ein Doppelstrang oder Duplex gebildet wird. Im zweiten Fall können zwei Moleküle des Nukleinsäure-bindenden Oligomers einen Komplex mit der ausgewählten Region einer Nukleinsäure bilden, wobei ein Tripelhelixstrang oder ein Triplex gebildet wird. Nukleinsäure-bindende Oligomere sind beispielsweise peptidische Nukleinsäuren, wie sie aus WO92/20 702 bekannt sind. Von der vorliegenden Erfindung erfaßt werden jedoch nicht nur PNA mit identischen, sich wiederholenden Rückgratgruppen, sondern auch Nukleinsäure-bindende Oligomere, bei denen das Rückgrat aus verschiedenen monomeren Untereinheiten besteht, und wie sie in WO

- 11 -

95/14 706 offenbart werden. Weiterhin erfaßt werden Verbindungen gemäß EP-A-0 627 677, wo gemischte Strukturen aus peptidgebundenen Monomeren und Oligonukleotiduntereinheiten offenbart werden. Außerdem werden Verbindungen erfaßt, wie sie in WO 96/20 212 und EP-A-0 700 928 offenbart werden. Die zuvor genannten Dokumente werden durch die Bezugnahme zum Bestandteil der Beschreibung.

Besonders bevorzugte Nukleinsäure-bindende Oligomere sind peptidische Nukleinsäuren gemäß Formel (III):



worin:

- n eine ganze Zahl von mindestens 3 ist,
- x eine ganze Zahl von 2 bis n-1 ist,
- jede der Gruppen B<sup>1</sup> bis B<sup>n</sup> eine Nukleobase wie zuvor definiert ist,

jede der Gruppen C<sup>1</sup>-C<sup>n</sup> die Bedeutung (CR<sup>6</sup>R<sup>7</sup>)<sub>y</sub>, vorzugsweise CR<sup>6</sup>R<sup>7</sup>, CHR<sup>6</sup>CHR<sup>7</sup> oder CR<sup>6</sup>R<sup>7</sup>CH<sub>2</sub>, aufweist, wobei R<sup>6</sup> Wasserstoff ist und R<sup>7</sup> ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus den Seitenketten natürlich vorkommender alpha-Aminosäuren oder R<sup>6</sup> und R<sup>7</sup> unabhängig ausgewählt werden aus der Gruppe bestehend aus Wasserstoff, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkyl, Aryl, Aralkyl, Heteroaryl, Hydroxy, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkoxy, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>- Alkylthio, NR<sup>3</sup>R<sup>4</sup> und SR<sup>5</sup>, wobei R<sup>3</sup> und R<sup>4</sup> wie im folgenden definiert sind und R<sup>5</sup> Wasserstoff, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkyl oder mit Hydroxy, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> Alkoxy oder C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkylthio-substituiertes C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> Alkyl ist, oder R<sup>6</sup> und R<sup>7</sup> zusammen ein alicyclisches oder

- 12 -

ein heterocyclisches System bilden oder C<sup>1</sup>-C<sup>n</sup> CO, CS oder CNR<sup>3</sup> ist;

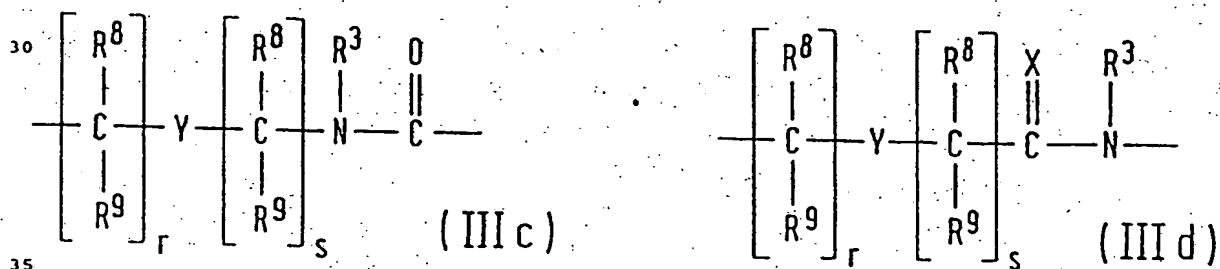
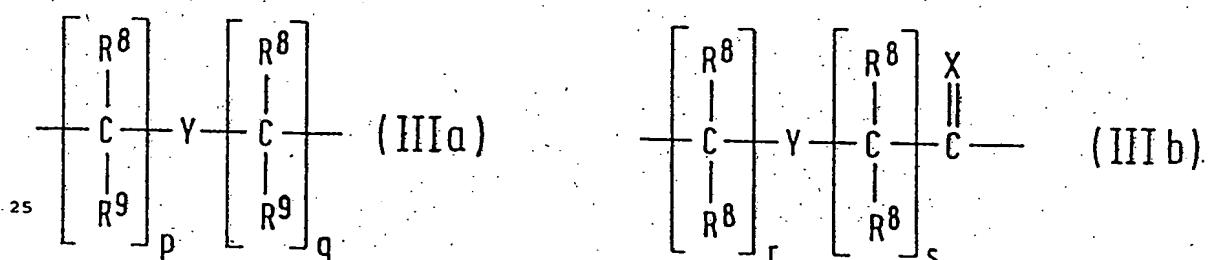
jeder der Reste D<sup>1</sup>-D<sup>n</sup> die Bedeutung (CR<sup>6</sup>R<sup>7</sup>)<sub>z</sub>, vorzugsweise CR<sup>6</sup>R<sup>7</sup>,  
 5 CHR<sup>6</sup>CHR<sup>7</sup> oder CH<sup>2</sup>CR<sup>6</sup>CR<sup>7</sup> aufweist, wobei R<sup>6</sup> und R<sup>7</sup> wie zuvor defi-  
 niert sind, y und z ganze Zahlen von 0 bis 10 sind, wobei die  
 Summe von y + z mindestens 2, vorzugsweise mehr als 2 aber  
 nicht mehr als 10 ist;

10 jeder der Reste G<sup>1</sup>-G<sup>n-1</sup> die Bedeutung -NR<sup>3</sup>CO-, -NR<sup>3</sup>CS-, -NR<sup>3</sup>SO-  
 oder -NR<sup>3</sup>SO<sub>2</sub> in beliebiger Orientierung aufweist, wobei R<sup>3</sup> wie  
 im folgenden definiert ist;

jeder der Reste A<sup>1</sup>-A<sup>n</sup> und E<sup>1</sup>-E<sup>n</sup> so ausgewählt sind, daß:  
 15

(a) A<sup>1</sup>-A<sup>n</sup> eine Gruppe der Formel (IIIa), (IIIb), (IIIc) oder  
 (IIId) ist und E<sup>1</sup>-E<sup>n</sup> N oder R<sup>3</sup> N<sup>+</sup> ist oder

20 (b) A<sup>1</sup>-A<sup>n</sup> eine Gruppe der Formel (IIId) ist und E<sup>1</sup>-E<sup>n</sup> CH ist:



- 13 -

worin:

X O, S, Se, NR<sup>3</sup>, CH<sub>2</sub> oder C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> ist,

5 Y eine Einfachbindung, O, S oder NR<sup>4</sup> ist,

p und q jeweils eine ganze Zahl von 0 bis 5 sind, wobei die Summe p + q vorzugsweise nicht größer als 5 ist;

10 r und s jeweils ganze Zahlen von 0 bis 5 sind, wobei die Summe r + s vorzugsweise nicht größer als 5 ist;

jeder der Reste R<sup>8</sup> und R<sup>9</sup> unabhängig ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Wasserstoff, Hydroxy, Amin, Halogen, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, 15 Alkoxy, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> Alkythio und gegebenenfalls substituiertem C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> Alkyl, wobei die Substituenten vorzugsweise aus Hydroxy-, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkoxy- oder C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkylthiogruppen ausgewählt werden;

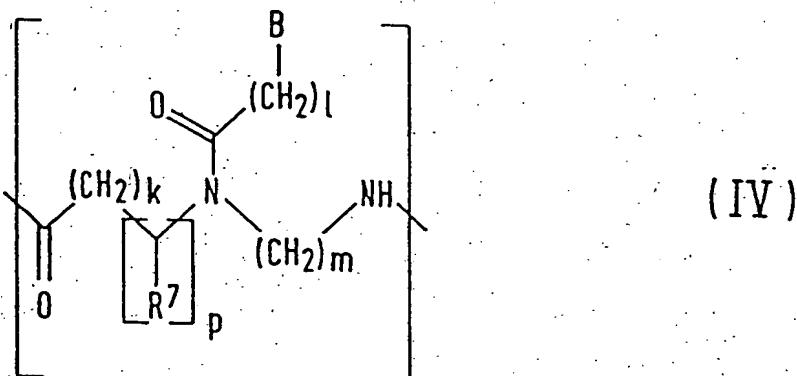
jeder der Reste R<sup>3</sup> und R<sup>4</sup> unabhängig ausgewählt ist aus der 20 Gruppe bestehend aus Wasserstoff, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> Alkyl, das gegebenenfalls mit Hydroxy- oder C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkoxy- oder C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> Alkylthio-substituiert ist, Hydroxy, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> Alkoxy, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> Alkythio und Amin;

Q' und I' unabhängig ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend 25 aus NH<sub>2</sub>, CONH<sub>2</sub>, COOH, Wasserstoff, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> Alkyl, O(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkyl, einem durch eine Schutzgruppe blockierten Amin, Markierungsgruppen, Intercalatoren, Chelatoren, Peptiden, Proteinen, Kohlehydraten, Lipiden, Steroiden, Nukleosiden, Nukleotiden, Nukleosiddiphosphaten, Nukleosidtriphosphaten, Oligonnukleotiden, 30 einschließlich Oligoribonukleotiden und Oligodeoxyribonukleotiden, Oligonukleosiden und löslichen und unlöslichen Polymeren sowie Nukleinsäure-bindenden Gruppen und

x<sub>1</sub> und y<sub>1</sub> jeweils eine ganze Zahl von 0 bis 10 ist, wobei die 35 Verbindung dadurch gekennzeichnet ist, daß an mindestens einer Nukleobase oder/und an einer Position des Peptidrückgrats eine Gruppe L wie zuvor definiert vorliegt.

- 14 -

Am meisten bevorzugt umfassen die Nukleinsäure-bindenden Oligomere mindestens eine monomere Untereinheit der allgemeinen Formel (IV) :



is worin:

B eine Nukleobase wie zuvor definiert ist,

k, l und m unabhängig eine ganze Zahl von 0 bis 5 sind,

p 0 oder 1 ist und

R' ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Wasserstoff und den Seitenketten von natürlich vorkommenden Alpha-Aminosäuren.

Exemplarisch ist am Beispiel der Nukleobase Thymidin die Synthese von erfindungsgemäßen PNA-Bausteinen beschrieben, in die eine Allylaminogruppe eingeführt wurde, welche zur Kopplung an andere Gruppen, z. B. Markierungsgruppen wie etwa Ru(bipyridyl), fähig ist.

Die Synthese des in der Position C-5 aminomodifizierten Thymin-PNA-Bausteins gestaltete sich schwierig. Zwei verschiedene Synthesestrategien sind in Fig. 1 und Fig. 2 dargestellt. Gemäß Fig. 1 wurde ausgehend von Uracil (1) und Bromessigsäuremethylester Uracil-1-Essigsäuremethylester (2) hergestellt,

- 15 -

der dann zum entsprechenden Natriumsalz (3) mit Natronlauge verseift wurde. Die Umsetzung von 2 mit Z-geschütztem Allylamin 4 über eine oxidative Kupplung mit  $Pd(OAc)_2$ , und t-Butylperbenzoat nach der Methode von Hirota et al., (Synthesis 1987, 495 - 496), in der die Reaktion von Uracil- und Uridin-Derivaten beschrieben ist, gelang nicht. Auch die in der Nukleinsäurechemie gebräuchlichste Methode, die C-C-Verknüpfung an der C-5-Position durch direkte Merkurierung von ungeschütztem 2'-Deoxyuridin oder -Cytidin und nachfolgende Alkylierung 10 in Gegenwart von Olefinen (Bergstrom et al., J. Carbohydrates, Nucleosides, Nucleotides 4 (1977), 257; Bergstrom et al., J. Am. Chem. Soc. 98 (1976) 1587; Cook et al., Nucleic Acids Res. 16 (1988), 4077), führte nicht zum Erfolg.

15 Erstaunlicherweise, wie in Fig. 2 ersichtlich, führte gerade die Anwendung einer Modifikation der Heck-Reaktion (Heck, J. Am. Chem. Soc. 90 (1968), 5518) zur gewünschten C-C-Verknüpfung führte. Zuerst wurde 5-Joduracil (5) mit Bromessigsäuremethylester zum 5-Jodoruracil-1-essigsäuremethylester (6) 20 alkyliert. Die Heck-Reaktion von 6 mit Z-geschütztem Allylamin in Gegenwart von  $Pd(OAc)_2$ , und Triphenylphosphin in absolutem Acetonitril wurde unter Luftausschluß und bei überhöhter Temperatur ( $110^{\circ}C$  Badtemperatur) durchgeführt und ergab die Verbindung (7) zusammen mit einem geringen Anteil des oxidierten 25 Nebenprodukts (8). Der Methylester (7) wurde dann zur freien Säure (8) verseift und mit 2-Boc-Aminoethylglycinmethylester (7) analog mit der Methode von Dueholm et al., (J. Org. Chem. 59 (1994), 5767) umgesetzt. Nach alkalischer Hydrolyse des Esters wurde der gewünschte aminomodifizierte Thymin-PNA-Bau- 30 stein (11) erhalten.

Der Z-geschützte D-Lys-Thymin-Baustein 12, der eine zur Koppfung fähige Gruppe am Peptidrückgrat trägt (Fig.3) ist eine bekannte Verbindung, die bislang zur Herstellung von PNA Sequenzen mit verbesserter Löslichkeit Verwendung fand.

- 16 -

Die PNA-Synthese erfolgte nach der in T. Koch et al., Automated PNA Synthesis, Int. J. Peptide Protein Res., im Druck, dargestellten Weise auf einem ABI433A Peptid-Synthesizer. In Fig. 4 sind die eingesetzten kupplungsfähigen Komponenten, die 5 Boc/Z-PNA-Standardmonomere, Ado-Linker, die verwendeten Markierungsgruppen Ru(bpy)<sub>3</sub>-Säure, Ru(bpy)<sub>3</sub>-Lys und Biotin) sowie das mit Boc-Gly derivatisierte MBHA-Harz aufgeführt. Für die 10 Markierung innerhalb des PNA-Strangs wurden die Monomerbausteine 11 (Fig. 2) und 12 (Fig. 3) eingebaut. Die PNA-Oligomere wurden über RP18 HPLC gereinigt. PNA-Moleküle, in die die 15 Bausteine 11 oder 12 eingebaut worden waren, wurden mit Ru(bpy)<sub>3</sub>-OSu in DMSO und wässrigem 0,1 M NaHCO<sub>3</sub> nachträglich markiert.

15 Die erfindungsgemäßen Nukleinsäure-bindenden Oligomere können natürlich auf verschiedene Arten synthetisiert werden. So wird in den Beispielen der vorliegenden Anmeldung eine Boc/Z-Schutzgruppenstrategie angewandt, d. h. die intermediäre Schutzgruppe der PNA-Monomerbausteine ist Boc (Abspaltung mit 20 Trifluoressigsäure), die Nukleobasen sind mit Z(Benzylloxycarbonyl; Abspaltung mit Trifluormethansulfonsäure/Trifluoressigsäure-Gemisch) geschützt. Die auf den erfindungsgemäßen modifizierten Monomeren vorhandenen Aminogruppen können bei dieser 25 Synthesestrategie ebenfalls mit Z geschützt werden.

Eine andere Synthesestrategie ist in DE-A-44 08 531 beschrieben. Dort werden schwach säurelabile intermediäre Schutzgruppen im PNA Monomer verwendet, vor allem Monomethoxytrityl. Die 30 Aminogruppen der Nukleobasen sind mit gegen schwache Säuren kompatiblen Schutzgruppen geschützt, z. B. Acylschutzgruppen (Benzoyl, Isobutyryl, Acetyl etc.). Durch die erfindungsgemäße Modifizierung eingeführt zusätzliche Aminosäuren sollten bei dieser Strategie mit Trifluoracetyl oder Fmoc geschützt sein.

35 Bei der in DE-A-44 08 533 beschriebenen Synthesestrategie werden basenlabile intermediäre Aminoschutzgruppen zur PNA-Synthese verwendet, vor allem Fmoc. Die Nukleobasen sind mit

gegen Base kompatiblen Schutzgruppen geschützt, z. B. Monomethoxytrityl, Boc etc. Die zusätzliche, durch die erfindungsgemäße Modifikation eingeführte und während der Synthese permanent zu schützende Aminogruppe kann hier auch mit Monomethoxytrityl oder Boc geschützt werden.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Nukleinsäure-bindendes peptidisches Oligomer, welches mindestens einen monomeren Baustein enthält, der eine Markierungsgruppe gekoppelt an eine Nukleobase oder/und an das Peptidrückgrad enthält. Vorzugsweise enthält das Nukleinsäure-bindende Oligomer mindestens einen monomeren Baustein ausgewählt aus Verbindungen aus der Formel (I) und (II). Weiterhin ist bevorzugt, daß bei Hybridisierung des erfindungsgemäßen Oligomers mit einer komplementären Nukleinsäure (1) das resultierende Hybrid, 15 welches ein Doppelstrang oder ein Tripelstrang sein kann, einen höheren Schmelzpunkt als ein Hybrid aufweist, das ein Oligomer mit gleicher Sequenz, aber ohne Markierungsgruppe enthält oder (2) eine schwächere Destabilisierung in einem 20 PNA-Nukleinsäure-Hybrid erfolgt als in einem Nukleinsäure-Nukleinsäure-Hybrid.

Das erfindungsgemäße Oligomer kann mehrere gleiche oder unterschiedliche Markierungsgruppen enthalten und darüber hinaus 25 zusätzlich am N- und C-Terminus mit weiteren gleichen oder unterschiedlichen Markierungsgruppen gekoppelt sein. Besonders bevorzugt ist das erfindungsgemäße Oligomer eine peptidische Nukleinsäure und weist eine Struktur der allgemeinen Formel (III) wie zuvor definiert auf. Die PNA enthält vorzugsweise 30 mindestens einen monomeren Baustein der allgemeinen Formel (IV) wie zuvor definiert.

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäure-bindenden Oligomere werden zur Hybridisierung an Nukleinsäuren eingesetzt. Dabei kommen 35 einerseits Verfahren zum Nachweis oder/und Isolierung von Nukleinsäuren in Betracht, z. B. diagnostische Nachweisverfahren. Andererseits können die erfindungsgemäßen Oligomere,

- 18 -

insbesondere wenn L eine pharmazeutisch wirksame Gruppe ist, auch in therapeutischen Verfahren, z. B. als Antisense-Moleküle eingesetzt werden.

5 Noch ein Gegenstand der Erfindung sind Reagenzien und Reagenzienkits zur Hybridisierung mit Nukleinsäuren, die neben anderen Testkomponenten ein erfindungsgemäßes Nukleinssäure-bindendes Oligomer enthalten.

10 Weiterhin soll die Erfindung durch die nachfolgenden Sequenzprotokolle, Abbildungen und Beispiele erläutert werden. Es zeigen:

SEQ ID NO. 1: die Nukleotidsequenz einer Chlamydien-Sonde,

15 SEQ ID NO. 2: die Nukleotidsequenz einer Referenz- bzw. Ge- genstrangsonde zu der in SEQ ID NO. 1 gezeigten Sequenz,

Fig. 1 die schematische Darstellung von Synthesestrategien, mit denen die Herstellung erfindungsgemäßer Monomerbausteine nicht gelingt,

20 Fig. 2 die schematische Darstellung einer Synthesestrategie, mit der die Herstellung erfindungsgemäßer Monomerbausteine (z. B. 11) gelingt,

Fig. 3 die Struktur eines PNA-Monomers (12), das zur Einführung von Markierungsgruppen am Peptidrückgrat geeignet ist und,

25 Fig. 4 die Strukturen von PNA-Monomeren, Linkern, Markierungsgruppen und einem Syntheseträgerharz.

30 Beispiel 1  
Herstellung von 5-Ioduracil-1-essigsäuremethylester (Verbindung 6)

6 g 5-Ioduracil (Aldrich) werden in 75 ml absolutem DMF gelöst. Dazu gibt man 3,48 g Kaliumcarbonat und 2,4 ml Bromessigsäuremethylester (Merck). Der Ansatz wird unter einer Argonatmosphäre über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Der An-

- 19 -

satz wird filtriert und im Vakuum zur Trockene eingeengt. Der Rückstand wird in 60 ml Wasser und 10 ml 2 M Salzsäure aufgenommen und 1 Stunde bei 0°C stark gerührt. Ein farbloser Niederschlag fällt aus. Dieser wird abgesaugt und mit Wasser neutral gewaschen. Der farblose Feststoff wird über Phosphorpentoxid im Exsikkator getrocknet.

Ausbeute: 7,3 g (93 %)

Fp: 183 - 184°C

$R_f$  = 0,51 (Kieselgel; Dichlormethan/Methanol 100 : 6)

<sup>10</sup>  $^1\text{H-NMR}$  ( $d_6$ -DMSO, ppm) : 11,80 (sb, 1H, NH), 8,21 (s, 1H H-C(6)), 4,53 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3,70 (s, 2H,  $\text{OCH}_3$ )

### Beispiel 2

#### Herstellung von N-Benzylloxycarbonylallylamin (Verbindung 4)

15

10,4 ml Allylamin und 19 ml Triethylamin werden in 50 ml absolutem Toluol gelöst. Zu der im Eisbad gekühlten Lösung tropft man unter Rühren eine 50%ige Benzylchloroformiat-Lösung in Toluol (46,8 ml) zu. Zur Vervollständigung der Reaktion <sup>20</sup> wird noch 1 Stunde bei Raumtemperatur weitergerührt. Ein gebildeter Niederschlag wird abfiltriert. Danach wird das Filtrat eingeengt und am Hochvakuum bis zur Gewichtskonstanz getrocknet (70°C, 0,5 mbar).

Ausbeute: 19,8 g (74 %)

<sup>25</sup>  $R_f$  = 0,79 (Kieselgel, Petrolether/Essigsäureethylester 1:1)

<sup>1</sup>H-NMR ( $d_6$ -DMSO, ppm): 7,49 - 7,08 (m, 5H, Phenyl), 6,01 - 5,64 (m, 1H, =CH(Allyl)), 5,23 - 4,57 (m, 3H, =CH<sub>2</sub> (Allyl), NH), 5,11 (s, 2H,  $\text{CH}_2$  (Benzyl)), 3,74 - 3,60 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{N}$ )

### 30 Beispiel 3

#### Herstellung von 5-(N-Benzylloxycarbonyl-aminoallyl)uracil-1-essigsäuremethylester (Verbindung 7)

1 g 5-Ioduracil-1-essigsäuremethylester wird zweimal mit je 20 <sup>35</sup> ml absolutem Acetonitril koevaporiert und mit Argon belüftet. Danach gibt man 1,2 g N-Z-Allylamin, 80 mg Palladium (II) acetat, 0,18 g Triphenylphosphin, 0,9 ml Triethylamin und 40

- 20 -

ml absolutes Acetonitril zu. Der Reaktionsansatz wird unter einer Argon-Atmosphäre 100 Stunden bei einer Ölbadtemperatur von 115 °C stark gerührt. Es entsteht ein Metallspiegel. Nach Abkühlen wird in die Lösung Schwefelwasserstoff eingeleitet, dann wird der gebildete schwarze Niederschlag über ein Seitzfilter abfiltriert. Das Filtrat wird dann am Rotationsverdampfer zur Trockene eingeengt, in 20 ml Essigsäureethylester gelöst und über Flash-Chromatographie (Kieselgel, 30 x 5 cm) mit Petrolether/Essigsäureethylester 2 : 3 aufgereinigt. Die Produktfraktionen und ein blau fluoreszierendes Oxidationsnebenprodukt (5-(N-Benzylloxycarbonyl-1-propin-3-amino-1-yl)uracil-1-essigsäure-methylester) werden im Rotationsverdampfer zur Trockene eingeengt und im Hochvakuum bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

15 Produktausbeute: 0,54 g (45 %) gelblicher Feststoff

$R_f$  = 0,22 (Kieselgel, Petrolether/Essigsäureethylester 2 : 3)

Fp: 131 - 133 °C

16  $^1\text{H-NMR}$  ( $d_6$ -DMSO, ppm) : 11,53 (sb, 1H, NH (Uracil)), 7,84 (s, 1H, H-C(6)), 7,50 (b, 1H, NH), 7,35 (m, 5H, Phenyl), 6,55 - 20 6,02 (m, 2H, 2x =CH), 5,04 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4,55 (s, 2H,  $\text{NCH}_2\text{COO}$ ), 3,90 - 3,64 (m, 2H = $\text{CH}_2$ ), 3,71 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ )

Nebenproduktausbeute: 0,38 g

$R_f$  (Nebenprodukt) = 0,3 (Kieselgel, Petrolether/Essigsäureethylester 2 : 3)

25 17  $^1\text{H-NMR}$  des Nebenprodukts ( $d_6$ -DMSO, ppm): 11,41 (sb, 1H, NH (Uracil)), 9,14 (db, 1H NH), 7,53 (s, 1H, H-C(6)), 7,45 - 7,19 (m, 5H, Phenyl), 5,14 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4,54 (s, 2H,  $\text{NCH}_2\text{COO}$ ), 3,70 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 1,79 (D, 2H,  $\text{CH}_2\text{NHCOOPH}$ )

30 Beispiel 4:

Herstellung von 5-(N-Benzylloxycarbonyl-aminoallyl)uracil-1-essigsäure (Verbindung 9)

1 g 5-(N-Benzylloxycarbonyl-aminoallyl)uracil-1-essigsäuremethylester wird in 20 ml Tetrahydrofuran (THF) und 10 ml 1 M Lithiumhydroxid über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend das THF am Rotationsverdampfer entfernt. Die

- 21 -

zurückgebliebene Lösung wird mit 10 ml Wasser verdünnt und mit 2 M Salzsäure auf pH2 eingestellt. Anschließend wird dreimal mit je 70 ml Essigsäureethylester ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer zur Trockene eingeengt. Der bräunliche Feststoff wird bis zur Gewichtskonstanz am Hochvakuum getrocknet.

Ausbeute: 0,72 g (73 %)

R<sub>f</sub> = 0,47 (Kieselgel, n-Butanol/Eisessig/Wasser 4 : 1 : 1)

10 Fp: 168 - 170 °C

<sup>1</sup>H-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO, ppm) : < 12 (1H, COOH), 11,47 (sb, 1H, NH (Uracil)), 7,83 (s, 1H, H-C (6)), 7,48 (b, 1H, NH), 7,35 (m, 5H, Phenyl), 6,53 - 6,01 (m, 2H, 2x =CH), 5,03 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4,42 (s, 2H, NCH<sub>2</sub>COO), 3,71 (t, 2H, CH<sub>2</sub>N (Allyl))

15

Beispiel 5:

Herstellung N-(2-tert-Butyloxycarbonyl-aminoethyl)-N'-[5-(N-benzyloxycarbonyl-aminoallyl)uracil-1-ylacetyl]glycinmethylester

20

9,36 g 5-(N-Benzylloxycarbonyl-aminoallyl)uracil-1-essigsäure werden in 10 ml absolutem Dimethylformamid (DMF) gelöst. Zu der Lösung gibt man frisch aktiviertes Molekularsieb 4A, 244 µl Diisopropylethylamin und 364 mg O-(Benzotriazol-1-yl)-25 1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat (HBTU). Danach röhrt man 30 min bei Raumtemperatur. Anschließend gibt man 159 mg Methyl-N-(2-Boc-aminoethyl)glycinat (K. L. Duoholm et al., Org. Prep. Int., 1993, 25, 457-461) in 5 ml DMF gelöst zu und röhrt weitere 3 Stunden bei Raumtemperatur. Danach wird 30 das Molekularsieb abfiltriert und das Filtrat am Hochvakuum eingeengt. Der Rückstand wird in wenig Essigsäureethylester aufgenommen, von dem gebildeten Niederschlag filtriert man ab. Das Filtrat wird auf ein Volumen von ca. 3 ml eingeengt und über Flash-Chromatographie (Kieselgel, 25 x 2,5 cm) mit Petrolether/Essigsäureethylester 1 : 3 als Eluens gereinigt. Die verreinigten Produktfraktionen werden eingeengt und am Hochvakuum getrocknet.

- 22 -

Ausbeute: 0,29 g (78 %) farbloses Kristallisat

$R_f$  = 0,76 (Kieselgel, n-Butanol/Eisessig/Wasser 4:2:1)

$^1\text{H-NMR}$  ( $d_6$ -DMSO, ppm): 11,41 (sb, 1H, NH, (Uracil)), 6,92 - 6,00 (m, 3H, NH, 2x =CH), 5,02 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4,71 - 4,31, 4,06, 3,71 (3 x 2H, 3 x  $\text{NCH}_2\text{CO}$ ), 3,63 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3,40 - 3,00 (m, 4H, 2 x  $\text{CH}_2\text{N}$ )

Beispiel 6:

Herstellung von N-(2-tert-Butyloxycarbonyl-aminoethyl)-N'-(5-N-butyloxycarbonyl-aminoallyl)uracil-1-ylacetylglycin (Verbindung 11)

290 mg N-(2-tert-Butyloxycarbonyl-aminoethyl)-N'-(N-butyloxycarbonyl-aminoallyl)-uracil-1-ylacetyl]glycinnmethylester werden in 10 ml THF und 5 ml 1 M Lithiumhydroxid-Lösung 4 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird das THF am Rotationsverdampfer abgezogen. Der Rückstand wird mit 20 ml Wasser verdünnt und dreimal mit je 50 ml Essigsäureethylester ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert, am Rotationsverdampfer zur Trockene eingeengt und am Hochvakuum getrocknet.

Ausbeute: 270 mg (97 %)

$R_f$  = 0,67 (Kieselgel, n-Butanol/Eisessig/Wasser 4 : 2 : 1)

Fp: 156 - 159 °C

UV (MeOH):  $\lambda_{\max}$  [nm] (log  $\epsilon$ ): 238 (4,12), 293 (3,98)

$^1\text{H-NMR}$  ( $d_6$ -DMSO, ppm): 12,7 (b, 1H, COOH), 11,38/11,36 (2s, 1H, NH, (Uracil), 7,63/7,58 (2s, 1H, H-C(6)), 7,44 (m, 1H, NH), 7,35 (m, 5H, Phenyl), 6,88/6,69 (2t, 2H, NH), 6,38 - 6,33/6,11 (m, d, 2H, 2x =CH), 5,02 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4,70/4,53 (2s, 2H,  $\text{NCH}_2\text{CO}$ ), 4,19/3,98 (2s, 2H,  $\text{NCH}_2\text{CH}$ ), 3,70 (m, 2H,  $\text{NCH}_2\text{CO}$  (Allyl)), 3,41 - 3,03 (m, 4H, 2 x  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 1,38/1,37 (2s, 9H, tBu) - Rotationsisomere ca. 2 : 1

- 23 -

**Beispiel 7:**

**Herstellung von Boc-Gly-MBHA-Trägermaterial**

2 g MBHA Harz (Novabiochem; 0,56 mmol/g) wird über Nacht in  
5 Dichlormethan quellen gelassen. Danach wird abgesaugt und mit  
5%iger Diisopropylethylamin-Lösung in N-Methylpyrrolidon (NMP)  
gewaschen. Danach gibt man 0,77 ml 0,26 M N-t.-Butyloxycarbo-  
nyl- (Boc)-Glycin in NMP, 0,8 ml 0,5 M Diisopropylethylamin in  
NMP und 0,96 ml 0,202 M O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-  
10 tetramethyluronium-hexafluorophosphat (HATU) in NMP zusammen,  
aktiviert für 2 min vor und verdünnt mit 5 ml NMP. Die Lösung  
gibt man dann zum Harz und schüttelt 2 Stunden. Danach saugt  
man ab und wäscht mehrmals mit NMP, Ethanol und Dichlormethan.  
Danach gibt man zum Harz 10 ml Essigsäureanhydrid/Pyridin/NMP  
15 1 : 2 : 2 und schüttelt über Nacht bei Raumtemperatur  
(Capping). Anschließend saugt man ab, wäscht mehrmals mit NMP,  
Ethanol und Dichlormethan und trocknet im Hochvakuum. Ein  
qualitativer Kaiser-Test ist negativ und indiziert quantitati-  
ves Capping. Die Beladung wird mit einem quantitativen Kaiser-  
20 Test (nach ABI 433 A Synthesizer Manual) bestimmt.  
Beladung: 70  $\mu$ mol/g.

**Beispiel 8:**

**PNA-Synthese (PNA-Monomere und markierte monomere Bausteine 11  
25 und 12)**

Die PNA-Synthese erfolgt auf einen ABI 433A Peptid-Synthesizer  
der Firma Applied-Biosystems mit modifizierter Software. Die  
Synthesen werden in 5  $\mu$ mol Mengen in einem 3 ml Reaktionsgefäß  
30 durchgeführt. Es wird eine kleinere Meßschleife (150  $\mu$ l) ver-  
wendet. Die Monomerbausteine werden in NMP gelöst und in indi-  
viduelle Kartuschen eingespritzt (140  $\mu$ l, 0,26 M). Das mit  
Boc-Gly derivatisierte MBHA-Trägermaterial wird in das 3 ml  
Reaktionsgefäß gefüllt und am Synthesizer angebracht. Tri-  
35 fluoressigsäure/m Cresol 95 : 5 (2 x 180 sec); Flaschenposi-  
tion 2) wird verwendet, um die Boc-Schutzgruppe abzuspalten.  
Je 2 Waschmodule (Dichlormethan- und NMP-Modul bestehend je-

- 24 -

weils 5 aufeinanderfolgenden Waschschriften) befinden sich zwischen Boc-Abspaltung und dem Kupplungsmodul (Dichlormethan = Flaschenposition 9; NMP = Flaschenposition 10). 140  $\mu$ l 0,26 M Monomer (36  $\mu$ mol), 150  $\mu$ l 0,21 M HATU in NMP (32  $\mu$ mol) und 150  $\mu$ l 0,5 M Diisopropylethylamin in NMP (75  $\mu$ mol) werden in jedem Kupplungsschritt gefördert (Diisopropylethylamin-Lösung = Flaschenposition 7; HATU-Lösung = Flaschenposition 8). Die Monomere werden in der Synthesekartusche voraktiviert (1 min), dann in das Reaktionsgefäß überführt. Die Kupplungszeit beträgt 10 min, die Monomerenkonzentration während der Kupplung beträgt 0,08 M. Nach dem Kupplungsmodul erfolgt ein Capping-Modul mit Essigsäureanhydrid/NMP/Pyridin 1 : 25 : 25 (1 min; Flaschenposition 4). Jeder Synthesezyklus wird mit einem NMP-Waschmodul abgeschlossen. Nach dem letzten Synthesezyklus folgt ein Dichlormethan-Waschmodul, um das Harz zu trocknen. Die Kupplungen gerade der modifizierten Bausteine werden durch einen qualitativen Kaiser-Test kontrolliert.

Die Abspaltung der PNA vom Harz und der Schutzgruppen erfolgt in einem manuellen Schritt außerhalb des Gerätes in einer verschließbaren Glasfritte. Das Harz wird zuerst mit Trifluoressigsäure (TFA) gewaschen, dann schüttelt man 1,5 Stunden mit 2 ml Trifluormethansulfonsäure/Trifluoressigsäure/m-Cresol (2 : 8 : 1). Die Abspaltlösung wird in ein Zentrifugenglas gesaugt. Man wäscht mit 1 ml Trifluoressigsäure nach und präzipitiert die PNA mit Diethylether. Das Präzipitat wird nach Zentrifugation von der überstehenden Lösung getrennt. Danach wäscht man zweimal mit Diethylether.

Die PNA werden über eine analytische RP18-HPLC Säule (Delta-Pak, Waters, 5  $\mu$ , 125 x 4 mm) mit einem Wasser/Acetonitril/0,1 % Trifluoressigsäure-Gradienten (0,2' 100 % A, 2-30' 100-60 % A, 30-33' 60 % A, 33-35' 60-0% A, 35-45' 0%, 45-50' 0-100 % A, 50-55' 100 % A; A = 0,1 % TFA in Wasser; B= 0,1 % TFA in 95 % Acetonitril; Flußrate 1 ml/min) bei 60 °C analysiert.

- 25 -

Die Reinigung erfolgt über eine präparative RP18-HPLC Säule (Nucleosil-RP18/Macherey-Nagel, 5 µ, 250 x 200 mm) mit demselben Elutionssystem( Gradient: 0-5' 100 % A, 5-40' 100-60% A, 40-45' 60 % A; 45-50' 60-0 % A, 50-60' = % A, 60-65' 0-100 % A, 65-70' 100 % A; A = 0,1 % TFA in Wasser, B = 0,1 % TFA in 95 % Acetonitril; Flußrate 5 ml/min) bei 60 °C.

Die Analyse der gereinigten PNAs wird massenspektrometrisch mit MALDITOF-MS durchgeführt.

10

**Beispiel 9:**

**PNA- und Oligonukleotidsynthese**

15 9.1 PNA-Synthese unter Verwendung des Bausteins 11 und Post-labeling mit dem N-Hydroxysuccinimidester der Ru(bipyridyl)<sub>3</sub>-Säure

20 Die PNA 20 wird nach dem oben beschriebenen Syntheseverfahren (Beispiel 8) hergestellt unter Verwendung des Bausteins 11 als Kupplungsbaustein an Position 12. Nach beendetem Synthesezyklus wird die terminale Boc-Schutzgruppe mit TFA/m-Cresol 95 : 5 abgespalten (180 sec). Danach wird das Harz mit aufeinanderfolgenden NMP- und Dichlormethan-Waschschriften gewaschen. Anschließend wird die terminale Aminofunktion mit Essigsäure-25 anhydrid/Pyridin/NMP 1 : 2 : 2 acetyliert (1 Stunde). Dann wird die Capping-Lösung abgesaugt und mit NMP und Dichlormethan gewaschen. Abspaltung und HPLC-Reinigung erfolgen wie oben (Beispiel 8) beschrieben. MALIDOTF-MS: 5545,9 ( $\Delta$  0,005 %).

30

Ein 43 OD<sub>260</sub> Aliquot der gereinigten PNA wird zur Trockene eingeengt. Die PNA wird dann in 0,1 M NaHCO<sub>3</sub>-Puffer pH 8,5 (1 ml) gelöst. Der pH wird überprüft und gegebenenfalls nachgestellt. danach gibt man 2 mg N-Hydroxysuccinimidester der Ru(bipyridyl)<sub>3</sub>-Säure (Boehringer Mannheim, Ident-Nr. 171 74 64) in 1 ml DMSO gelöst zu und schüttelt über Nacht, um die freigesetzte Aminofunktion des inkorporierten Bausteins 11 zu

- 26 -

markieren. Danach wird gegen Wasser dialysiert (1000 MWCO, SpectraPor 6). Anschließend wird zur Trockene eingeengt und über eine präparative RP 18 HPLC Säule (Nucleosil-RP18/Macherey-Nagel, 5 µ, 250 x 20 mm) gereinigt (Gradient: 0-5' 80 % A, 5-30' 80-60% A, 30-35' 60 % A, 35-65' 60-0 % A, 65-70' 0 % A, 70-75' 0-100 % A, A: 0,1 % TFA in Wasser, B: 0,1 % TFA in 95 % Acetonitril, Flußrate: 4 ml/min.

Ausbeute: 18 OD<sub>260</sub>

MS (MALDITOF: 6201,8 (Δ 0,02 %))

10

### 9.2 PNA-Synthese unter Verwendung des Bausteins 12 und Post-labeling mit dem N-Hydroxysuccinimidester der Ru-(bipyridyl)<sub>3</sub>-Säure

15 Die Synthese von Baustein 12 erfolgt wie bei G. Haaima et al., Angew. Chem., 1996, 108, 2068-2070 beschrieben.

Die PNA 21 wird nach dem oben beschriebenen Syntheseverfahren (Beispiel 8) hergestellt unter Verwendung des Bausteins 12 als 20 zwölften Kupplungsbaustein (5 µmol Maßstab).

Ausbeute: 114 OD<sub>260</sub>

MS (MALDITOF): 6228,0 (Δ 0,02 %)

### 9.3 Synthetisierte PNA-Moleküle

25

Folgende PNA-Moleküle werden hergestellt. Die Sequenz leitet sich aus einer Chlamydien-Sonde (mit der in SEQ ID NO. 1 angegebenen Basis-Nukleotidsequenz wie in 15 gezeigt) ab:

30	H-CAT AGC ACT ATA GAA CTC TG Gly-NH <sub>2</sub>	15
	Bio (Ado), CAT AGC ACT ATA GAA CTC TG Gly-NH <sub>2</sub>	17
	Ru Ado CAT AGC ACT ATA GAA CTC TG Gly-NH <sub>2</sub>	19
	Ac-CAT AGC AC(Ru-U) ATA GAA CTC TG Gly-NH <sub>2</sub>	20
	Ac-CAT AGC AC (T <sub>Lys-Ru</sub> ) ATA GAA CTC TG Gly-NH <sub>2</sub>	21
35	Ru Ado CAT AGC AC(Ru-U) ATA GAA CTC TG Gly-NH <sub>2</sub>	23
	Ru Ado CAT AGC ACT ATA GAA C(Ru-U)C TG Gly-NH <sub>2</sub>	25
	(Ru-Lys) (Ru-Lys) CAT AGC ACT ATA GAA CTC TG Gly-NH <sub>2</sub>	26

- 27 -

(Ru-Lys) (Ru-Lys) CAT AGC ACT ATA GAA CTC TG Gly-NH<sub>2</sub> 27

Dabei ist Ru-U der eingebaute Baustein 11, der an der Aminofunktion am C-5 von Uracil mit Ru(bpy)<sub>3</sub>-OSu postgelabelt wurde.

5 T<sub>Lys-Ru</sub> ist der eingebaute Baustein 12, der an der Aminofunktion des Lysins im Backbone mit Ru(bpy)<sub>3</sub>-OSu postgelabelt wurde. Ru-Lys, Ru, Bio und Ado haben die in Fig. 4 dargestellte Bedeutung.

#### 10 9.4 Synthetisierte Oligonukleotide

Als Referenz bzw. Gegenstrang werden folgende Oligonukleotide (mit der in SEQ ID NO.2 angegebenen Basis-Nukleotidsequenz wie in 13 bzw. SEQ ID NO 1 wie in 14 gezeigt) nach der Standard-15 Phosphoramiditmethode synthetisiert:

5'-CAG AGT TCT ATA GTG CTA TG-3'	13
5'-CAT AGC ACT ATA GAA CTC TG 3'	14
5'-Bio CAT AGC ACT ATA GAA CTC TG 3'	16
20 5'-Ru CAT AGC ACT ATA GAA CTC TG 3'	18
5'-Ru CAT AGC AC(Ru-U) ATA GAA CTC TG 3'	22
5'-Ru CAT AGC ACT ATA GAA C(Ru-U)C TG 3'	24

Ru-U ist hier das eingebaute DNA-Analogon zu Baustein 11, das 25 an der Aminofunktion am C-5 des Uracils mit Ru(bpy)<sub>3</sub>-OSu postgelabelt wurde. Das 5'-terminale Ru und Bio werden jeweils über das entsprechende Phosphoramidit-Derivat gekoppelt.

#### Beispiel 10:

#### 30 Bestimmung der Schmelztemperaturen

##### 10.1 Methodik

Die Bestimmung der Schmelztemperaturen von Hybriden zweier 35 komplementärer Oligomere erfolgt an einem Uvikon 931 Spectrophotometer der Fa. Kontron. Die Temperierung der Küvettenblöcke erfolgt über einen Haake DCS Heiz-/Kühl-Thermostaten,

die interne  $T_m$ -Kontrolle wird mittels eines PD10-Thermofühlers in einer Küvette durchgeführt. Es wird eine  $T_m$ -Software der Fa. Kontron verwendet. Es wird in 0,5 °C Schritten in 100 mM NaCl, 10 mM Na-Phosphat, 0,1 mM EDTA, pH 7 als Schmelzkurvenpuffer gemessen. Beide Oligomere werden äquimolar eingesetzt. Die Oligomerendkonzentration beträgt 2,5 nmol/ml.

## 10.2 Ergebnisse

Um den Einfluß des Labels bzw. der Labelposition sowie einen Stabilitätsvergleich von DNA-DNA- zu PNA-DNA-Duplex zu untersuchen, werden  $T_m$ -Experimente durchgeführt. Die  $T_m$ -Werte sind in Tab. 1 zusammengefaßt. Der  $T_m$  des DNA-DNA-Duplex liegt bei 56°C. Während 5'-Biotinylierung den  $T_m$  praktisch unbeeinflußt läßt (55,9°C) führt 5'-Ruthenylierung zu einem um 0,7°C leicht erhöhten  $T_m$  von 56,7°C. Das gleiche Bild zeigt sich im DNA-PNA-Duplex. Der ungelabelte PNA-DNA-Duplex hat einen  $T_m$  von 73,5°C, aminoterminaler Biotinylierung der PNA führt zu keiner Beeinflussung der Stabilität (73,5°C), aminoterminaler Ruthenylierung führt auch hier zu einer Stabilitätserhöhung von 0,7°C auf 74,2 °C.

Ru-Labeling an einer internen Lys-Aminofunktion (Baustein 12) liefert den gleichen Stabilitätsgewinn von 0,7°C auf 74,2°C wie aminoterminaler Ru-Einbau. Internes Ru-Labeling an der C-5 Position des Uracils (Baustein 11) führt sogar zu der höchsten Stabilisierung von 1,5°C auf 75,0°C. Überraschend war nun auch die Beobachtung, daß internes Ru-Labeling an der C-5-Basenposition des Uracils in DNA-DNA-Duplexen zu einer leichten Destabilisierung des Doppelstranges führt, während analoges internes Labeling der PNA zu einer Stabilisierung des PNA-DNA-Duplexes führt. Dies zeigt folgender Vergleich der zweifach ruthenylierten Derivate (Tm-Experiment 9 mit 10 und 11 mit 12): Während der DNA-Duplex abhängig von der Position der 2. Ru-Markierung um 2,3°C auf 54,4°C bzw. um 1,2°C auf 55,3°C gegenüber der 5'-Ru-Markierung destabilisiert wird, führt die analoge Einführung des 2. Ru-Labels über Baustein 11 in die

- 29 -

PNA neben der aminoterminalen Ru-Markierung zu einer Stabilisierung um  $2,3^{\circ}\text{C}$  auf  $76,5^{\circ}\text{C}$  bzw. zu einem unveränderten  $T_m$  von  $74,2^{\circ}\text{C}$ . Zweifaches Aminoterminalen Ru-labeling mit Ru-Lys führt ebenfalls zu einer Stabilisierung gegenüber Einfach-Ru-Labeling im PNA-DNA-Duplex von  $2,3^{\circ}\text{C}$  auf  $76,5^{\circ}\text{C}$ . Sind die terminalen Ru-Label über einen Ado-Linker getrennt, ist die Stabilisierung etwas niedriger ( $1,5^{\circ}\text{C}$ ).

- 30 -

Tab. 1: Tm-Experimente

Experiment	DNA/PNA	Konz. OD/ml	Vol. μl	10 X Puffer μl	Wasser μl	Tm
1	DNA 13	26,2	9,50	100	880	56,0
	DNA 14	24,8	10,00			
2	DNA 13	26,2	9,50	100	882	55,9
	5' Bio-DNA 16	30,9	8,00			
3	DNA 13	26,2	9,50	100	866	56,7
	5' Ru-DNA 18	10,2	24,50			
4	DNA 13	26,2	9,50	100	887	73,5
	PNA 15	73,2	3,40			
5	DNA 13	26,2	9,50	100	875	73,5
	5'-Bio-PNA 17	16,7	15,00			
6	DNA 13	26,2	9,50	100	874	74,2
	5'-Ru-PNA 19	15,1	16,50			
7	DNA 13	26,2	9,50	100	850	75,0
	U-Ru-PNA 20	6,2	40,30			
8	DNA 13	26,2	9,50	100	886	74,2
	Lys-Ru-PNA 21	56,8	4,40			
9	DNA 13	26,2	9,50	100	852	54,4
	5'-Ru-U-Ru-DNA 22	6,5	38,50			
10	DNA 13	26,2	9,50	100	874	76,5
	5'-Ru-U-Ru-PNA 23	15,4	16,20			
11	DNA 13	26,2	9,50	100	835	55,3
	5'-Ru-U-Ru-DNA 24	4,5	55,50			
12	DNA 13	26,2	9,50	100	856	74,2
	5'-Ru-U-Ru-PNA 26	7,2	34,70			
13	DNA 13	26,2	9,50	100	882	76,5
	5' 2XRu-Lys-PNA 26	30,5	8,20			
14	DNA 13	26,2	9,50	100	877	75,7
	5'-Ru-Lys-Ado-Ru-PNA 27	19,1	13,00			

- 31 -

### SEQUENZPROTOKOLL

#### (1) ALLGEMEINE ANGABEN:

##### 5 (i) ANMELDER:

- (A) NAME: Boehringer Mannheim GmbH
- (B) STRASSE: Sandhofer Strasse 112-132
- (C) ORT: Mannheim
- (D) LAND: DE
- (F) POSTLEITZAHL: 68305

10 15 (ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Neue Monomerbausteine zur  
Markierung von peptidi-  
schen Nucleinsäuren

20 25 (iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 2

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30  
(EPA)

30 35 (vi) DATEN DER URANMELDUNG:

- (A) ANMELDENUMMER: DE 197 12 530.1
- (B) ANMELDETAG: 25-MAR-1997

#### (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

##### 40 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 20 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

45 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

50 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

CATAGCACTA TAGAACTCTG

20

- 32 -

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 20 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

CAGAGTTCTA TAGTGCTATG

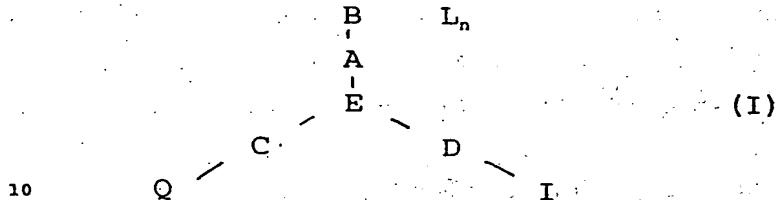
20

- 33 -

### Ansprüche

1. Verbindung der Formel (I)

5



10

worin:

- B eine natürliche oder nichtnatürliche Nukleobase ist, die gegebenenfalls eine Schutzgruppe trägt,
- L eine Markierungsgruppe oder eine zur Kopplung mit einer Markierungsgruppe fähige Gruppe ist, die gegebenenfalls eine Schutzgruppe trägt,
- A, C, D jeweils unabhängig voneinander chemische Bindungen oder organische Reste darstellen,
- E eine Gruppe ausgewählt aus N, R<sup>1</sup>N<sup>+</sup> oder CH ist, wobei R<sup>1</sup> ein organischer Rest oder Wasserstoff ist,
- Q eine Gruppe NR<sup>2</sup>Y ist, wobei R<sup>2</sup> ein organischer Rest oder Wasserstoff ist, und Y eine Schutzgruppe oder ein Träger ist und
- I eine Gruppe ausgewählt aus COX, CSX, SOX oder SO<sub>2</sub>X ist, wobei X OH, SH, OM, SM oder eine Schutzgruppe ist,
- M ein Kation ist und
- n eine ganze Zahl von 1 bis 3 ist.

30

2. Verbindung nach Anspruch 1,  
dadurch gekennzeichnet,

daß B eine Nukleobase ist ausgewählt aus Thymin, Uracil, Cytosin, Adenin, Guanin, Hypoxanthin, Purin, 7-Deazapurin, 2,4-Diaminopurin, 2,6-Diaminopurin, 7-Deazaguanin, Pseudouracil, Pseudocytosin, Pseudoisocytosin, N<sup>4</sup>,N<sup>6</sup>-Ethanoctosin, N<sup>6</sup>,N<sup>6</sup>-Ethano-2,6-diaminopurin, 5-(C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>)-Alki-

35

- 34 -

nylcytosin, 5-Fluoruracil oder 2-Hydroxy-5-methyl-4-triazolopyrimidin ist, wobei die Nukleobase gegebenenfalls eine Schutzgruppe trägt.

s 3. Verbindung nach Anspruch 1 oder 2,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß die Nukleobase eine Pyrimidinbase ist und die Gruppe L an die C-5 Position gebunden ist.

10 4. Verbindung nach Anspruch 1 oder 2,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß die Nukleobase Cytosin oder ein Derivat davon ist und die Gruppe L an die N-4 Position gebunden ist.

15 5. Verbindung nach Anspruch 1 oder 2,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß die Nukleobase eine Purinbase ist und die Gruppe L an die C-8 Position gebunden ist.

20 6. Verbindung nach Anspruch 1 oder 2,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß die Nukleobase eine Adenin oder ein Derivat davon ist und die Gruppe L an die N-6 Position gebunden ist.

25 7. Verbindung nach Anspruch 1 oder 2,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß die Nukleobase Guanin oder ein Derivat davon ist und die Gruppe L an die N-2 Position gebunden ist.

30 8. Verbindung nach Anspruch 1 oder 2,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß die Nukleobase ein 7-Deazapurin ist und die Gruppe L an die C-7 Position gebunden ist.

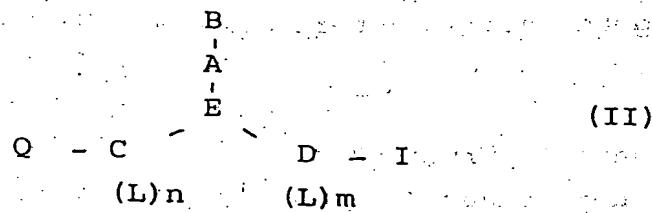
35 9. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 8,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß die Gruppe L eine signalgebende Gruppe ist.

10. Verbindung nach Anspruch 9,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß die Gruppe L ein lumineszierendes Metallchelat, Fluorescein oder Biotin ist.
11. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 8,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß die Gruppe L ein Rest ist, der zur Kopplung mit einer  
Markierungsgruppe fähig ist.
12. Verbindung nach Anspruch 11,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß L die Struktur -R'-NHY aufweist, wobei R' ein C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-  
Alkylen-, Alkenylen- oder Alkinylenrest ist, der gegebenenfalls Heteroatome enthält, und Y eine Schutzgruppe  
ist.
13. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 12,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß A ein C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-Alkylen-, Alkenylen- oder Alkinylenrest  
ist, der gegebenenfalls Heteroatome oder/und Substituen-  
ten enthält.
14. Verbindung nach Anspruch 13,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß A ein -CH<sub>2</sub>-CO-Rest ist.
15. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 14,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß C ein C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-Alkylen-, Alkenylen- oder Alkinylenrest  
ist, der gegebenenfalls Heteroatome oder/und Substituen-  
ten trägt.
16. Verbindung nach Anspruch 15,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß C ein -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-Rest ist.

- 36 -

17. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß D ein C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-Alkylen-, Alkenylen- oder Alkinylenrest ist, der gegebenenfalls Heteroatome oder/und Substituenten trägt.
18. Verbindung nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß D ein -CH<sub>2</sub>-Rest ist.
19. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß A und B oder A und D eine Ringstruktur bilden.
20. Verwendung von Verbindungen der Formel (I) nach einem der Ansprüche 1 bis 19 als monomere Bausteine bei der Synthese von Nukleinsäure-bindenden peptidischen Oligomeren.

21. Verbindung der Formel (II):



worin:

B, A, C, D, E, Q und I wie in Anspruch 1 definiert sind,  
 L eine Markierungsgruppe ist und  
 n und m 0 oder 1-3 sind, mit der Maßgabe, daß die Summe von n + m nicht 0 ist.

22. Verbindung nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß B eine Nukleobase ist aus Thymin, Uracil, Cytosin, Adenin, Guanin, Hypoxanthin, Purin, 7-Deazapurin, 2,4-

- 37 -

Diaminopurin, 2,6-Diaminopurin, 7-Deazaguanin, Pseudouracil, Pseudocytosin, Pseudoisocytosin, N<sup>4</sup>,N<sup>4</sup>-Ethanocytosin, N<sup>6</sup>,N<sup>6</sup>-Ethano-2,6-diaminopurin, 5-(C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkinylcytosin, 5-Fluoruracil oder 2-Hydroxy-5-methyl-4-triazolopyrimidin ist, wobei die Nukleobase gegebenenfalls eine Schutzgruppe trägt.

23. Verbindung nach Anspruch 21 oder 22,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß die Gruppe L ein lumineszierendes Metallchelat, Biotin oder Fluorescin ist.

24. Verbindung nach einem der Ansprüche 21 bis 23,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß A ein C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-Alkylen-, Alkenylen- oder Alkinylenrest ist, der gegebenenfalls Heteroatome oder/und Substituenten enthält.

25. Verbindung nach einem der Ansprüche 21 bis 24,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß A ein -CH<sub>2</sub>-CO-Rest ist.

26. Verbindung nach einem der Ansprüche 21 bis 25,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß C ein C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-Alkylen-, Alkenylen- oder Alkinylenrest ist, der gegebenenfalls Heteroatome oder/und Substituenten trägt.

27. Verbindung nach Anspruch 26,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß C ein -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-Rest ist.

28. Verbindung nach einem der Ansprüche 21 bis 27,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß D eine Gruppe -CH(R'-L)- ist, wobei R' ein organischer Rest ist.

29. Verbindung nach Anspruch 28,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß R' der Rest der Seitenkette einer natürlichen Amino-  
säure oder der entsprechenden enantiomeren Verbindung  
ist.
30. Verbindung nach einem der Ansprüche 28 bis 29,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß das asymmetrische C-Atom der Gruppe -C'H(R'-L)- eine  
D-Konfiguration aufweist.
31. Verbindung nach Anspruch 29 oder 30,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß R' der Rest einer Lysinseitenkette ist.
32. Verwendung von Verbindungen der Formel (II) nach einem  
der Ansprüche 21 bis 31 als monomere Bausteine bei der  
Synthese von Nukleinsäure-bindenden peptidischen Oligome-  
ren.
33. Nukleinsäure-bindendes Oligomer,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß es mindestens einen monomeren Baustein mit einer  
Markierungsgruppe gekoppelt an eine Nukleobase oder/und  
an ein Peptidrückgrat enthält.
34. Oligomer nach Anspruch 33,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß es mindestens einen monomeren Baustein enthält ausge-  
wählt aus Verbindungen der Formeln (I) und (II).
35. Oligomer nach Anspruch 33 oder 34,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß bei Hybridisierung mit einer komplementären Nuklein-  
säure (1) das resultierende Hybrid einen höheren Schmelz-  
punkt als ein Hybrid aufweist, das ein Oligomer ohne

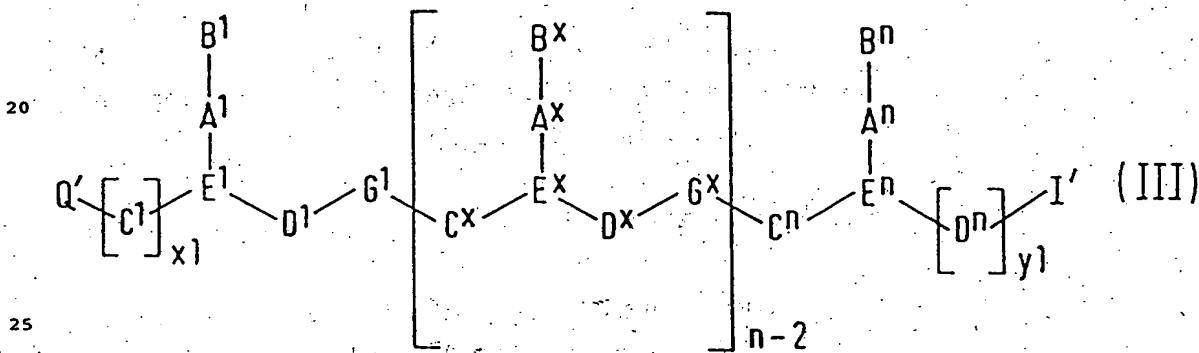
- 39 -

Markierungsgruppe enthält, oder (2) eine schwächere Destabilisierung in einem PNA-Nukleinsäure-Hybrid erfolgt als in einem Nukleinsäure-Nukleinsäure-Hybrid.

s 36. Oligomer nach einem der Ansprüche 33 bis 35,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß es mehrere gleiche oder unterschiedliche Markierungsgruppen enthält.

10 37. Oligomer nach einem der Ansprüche 33 bis 36,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß es zusätzlich aus N- oder/und C-Terminus mit Markierungsgruppen gekoppelt ist.

15 38. Nukleinsäure-bindendes Oligomer, das eine Struktur der allgemeinen Formel (III) aufweist:



worin:

30      n      eine ganze Zahl von mindestens 3 ist,  
 x      eine ganze Zahl von 2 bis n-1 ist,  
 jede der Gruppen B<sup>1</sup> bis B<sup>n</sup> eine Nukleobase wie zuvor definiert ist,

35      jede der Gruppen C<sup>1</sup>-C<sup>n</sup> die Bedeutung (CR<sup>6</sup>R<sup>7</sup>)<sub>x</sub> vorzugsweise CR<sup>6</sup>R<sup>7</sup>, CHR<sup>6</sup>CHR<sup>7</sup> oder CR<sup>6</sup>R<sup>7</sup>CH<sub>2</sub> aufweist, wobei R<sup>6</sup> Wasserstoff

- 40 -

ist und R<sup>7</sup> ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus den Seitenketten natürlich vorkommender alpha-Aminosäuren oder R<sup>6</sup> und R<sup>7</sup> unabhängig ausgewählt werden aus der Gruppe bestehend aus Wasserstoff, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkyl, Aryl, Aralkyl, Heteroaryl, Hydroxy, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkoxy, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkylthio, NR<sup>3</sup>R<sup>4</sup> und SR<sup>5</sup>, wobei R<sup>3</sup> und R<sup>4</sup> wie im folgenden definiert sind und R<sup>5</sup> Wasserstoff, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkyl oder mit Hydroxy, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> Alkoxy oder C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkylthio-substituiertes C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> Alkyl ist, oder R<sup>6</sup> und R<sup>7</sup> zusammen ein alicyclisches oder ein heterocyclisches System bilden oder C<sup>1</sup>-C<sup>n</sup> CO, CS oder CNR<sup>3</sup> ist;

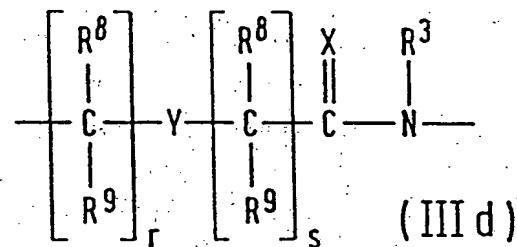
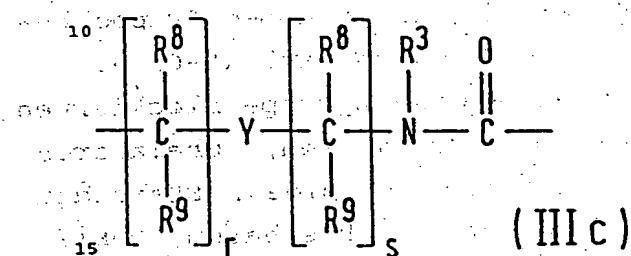
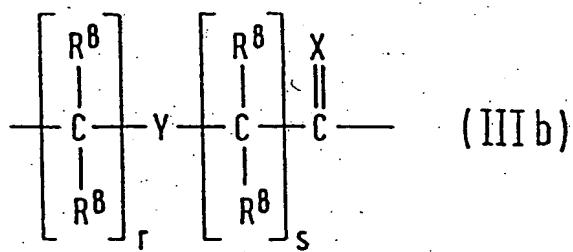
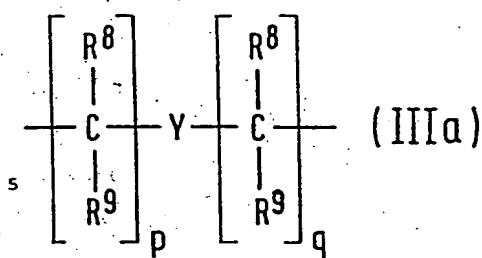
jeder der Reste D<sup>1</sup>-D<sup>n</sup> die Bedeutung (CR<sup>6</sup>R<sup>7</sup>), vorzugsweise CR<sup>6</sup>R<sup>7</sup>, CHR<sup>6</sup>CHR<sup>7</sup> oder CH<sup>2</sup>CR<sup>6</sup>CR<sup>7</sup> aufweist, wobei R<sup>6</sup> und R<sup>7</sup> wie zuvor definiert sind, y und z ganze Zahlen von 0 bis 10 sind, wobei die Summe von y + z mindestens 2, vorzugsweise mehr als 2 aber nicht mehr als 10 ist;

jeder der Reste G<sup>1</sup>-G<sup>n-1</sup> die Bedeutung -NR<sup>3</sup>CO-, -NR<sup>3</sup>CS-, -NR<sup>3</sup>SO- oder -NR<sup>3</sup>SO<sub>2</sub>, beliebiger Orientierung aufweist, wobei R<sup>3</sup> wie im folgenden definiert ist;

jeder der Reste A<sup>1</sup>-A<sup>n</sup> und E<sup>1</sup>-E<sup>n</sup> so ausgewählt sind, daß:

- (a) A<sup>1</sup>-A<sup>n</sup> eine Gruppe der Formel (IIIa), (IIIb), (IIIc) oder (IIId) ist und E<sup>1</sup>-E<sup>n</sup> N oder R<sup>3</sup> N<sup>+</sup> ist oder
- (b) A<sup>1</sup>-A<sup>n</sup> eine Gruppe der Formel (IIId) ist und E<sup>1</sup>-E<sup>n</sup> CH ist:

- 41 -



worin:

20

X : O, S, Se, NR<sup>3</sup>, CH<sub>2</sub> oder C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> ist,Y : eine Einfachbindung, O, S oder NR<sup>4</sup> ist,

25

p und q jeweils eine ganze Zahl von 0 bis 5 sind, wobei die Summe p + q vorzugsweise nicht größer als 5 ist;

30

r und s jeweils ganze Zahlen von 0 bis 5 sind, wobei die Summe r + s vorzugsweise nicht größer als 5 ist;

35

jeder der Reste R<sup>8</sup> und R<sup>9</sup> unabhängig ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Wasserstoff, Hydroxy, Amin, Halogen, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> Alkoxy, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> Alkythio und gegebenenfalls substituiertem C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> Alkyl, wobei die Substituenten vor-

- 42 -

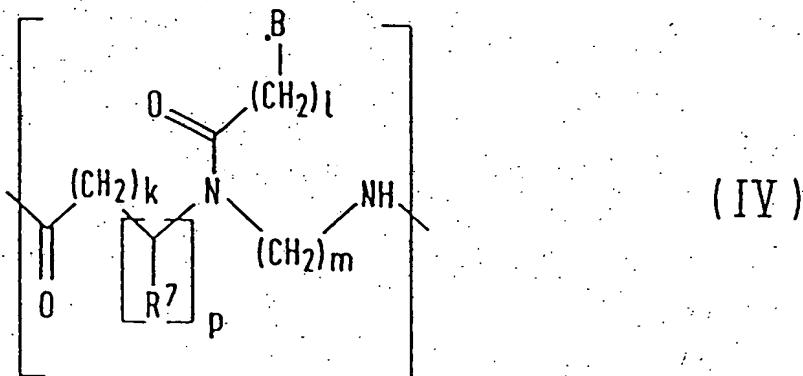
zugsweise aus Hydroxy-, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkoxy- oder C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkylthio-gruppen ausgewählt werden;

jeder der Reste R<sup>3</sup> und R<sup>4</sup> unabhängig ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Wasserstoff, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> Alkyl, das gegebenenfalls mit Hydroxy- oder C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkoxy- oder C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkylthio-substituiert ist, Hydroxy, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> Alkoxy, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> Alkythio und Amin;

Q' und I' unabhängig ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus NH<sub>2</sub>, CONH<sub>2</sub>, COOH, Wasserstoff, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> Alkyl, O(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkyl, einem durch eine Schutzgruppe blockierten Amin, Markierungsgruppen, Intercalatoren, Chelatoren, Peptiden, Proteinen, Kohlehydraten, Lipiden, Steroiden, Nukleosiden, Nukleotiden, Nukleosiddiphosphaten, Nukleosidtriphosphaten, Oligonukleotiden einschließlich Oligoribonukleotiden und Oligodeoxyribonukleotiden, Oligonukleosiden und löslichen und unlöslichen Polymeren sowie Nukleinsäure-bindenden Gruppen und

x<sub>1</sub> und y<sub>1</sub> jeweils eine ganze Zahl von 0 bis 10 ist, wobei die Verbindung dadurch gekennzeichnet ist, daß an mindestens einer Nukleobase oder/und an einer Position des Peptidrückgrats eine Gruppe L wie zuvor definiert vorliegt.

39. Oligomer nach Anspruch 38,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß es mindestens einen monomeren Baustein der allgemeinen Formel (IV) aufweist:



5        worin:

B        eine Nukleobase wie zuvor definiert ist,

10        k, i und m      unabhängig eine ganze Zahl von 0 bis 5  
              sind,

p        0 oder 1 ist und

15        R'      ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Wasser-  
              stoff und den Seitenketten von natürlich vorkommen-  
              den Alpha-Aminosäuren.

40.      Verwendung der Oligomere nach einem der Ansprüche 33 bis  
              39 zu Bindung von biologische Substanzen, insbesondere  
20        zur Hybridisierung mit Nukleinsäuren.

41.      Verwendung nach Anspruch 40 in einem Verfahren zum Nach-  
              weis oder/und zur Isolierung von Nukleinsäuren.

25 42.     Verwendung nach Anspruch 40 in einem therapeutischen Ver-  
              fahren.

43.      Reagenz zur Hybridisierung mit Nukleinsäuren,  
              dadurch gekennzeichnet,  
30        daß es ein Nukleinsäure-bindendes Oligomer nach einem der  
              Ansprüche 33 bis 39 enthält.

44.      Reagenzienkit zu Hybridisierung mit Nukleinsäuren,  
              dadurch gekennzeichnet,  
35        daß er neben anderen Testkomponenten ein Reagenz nach  
              Anspruch 43 enthält.

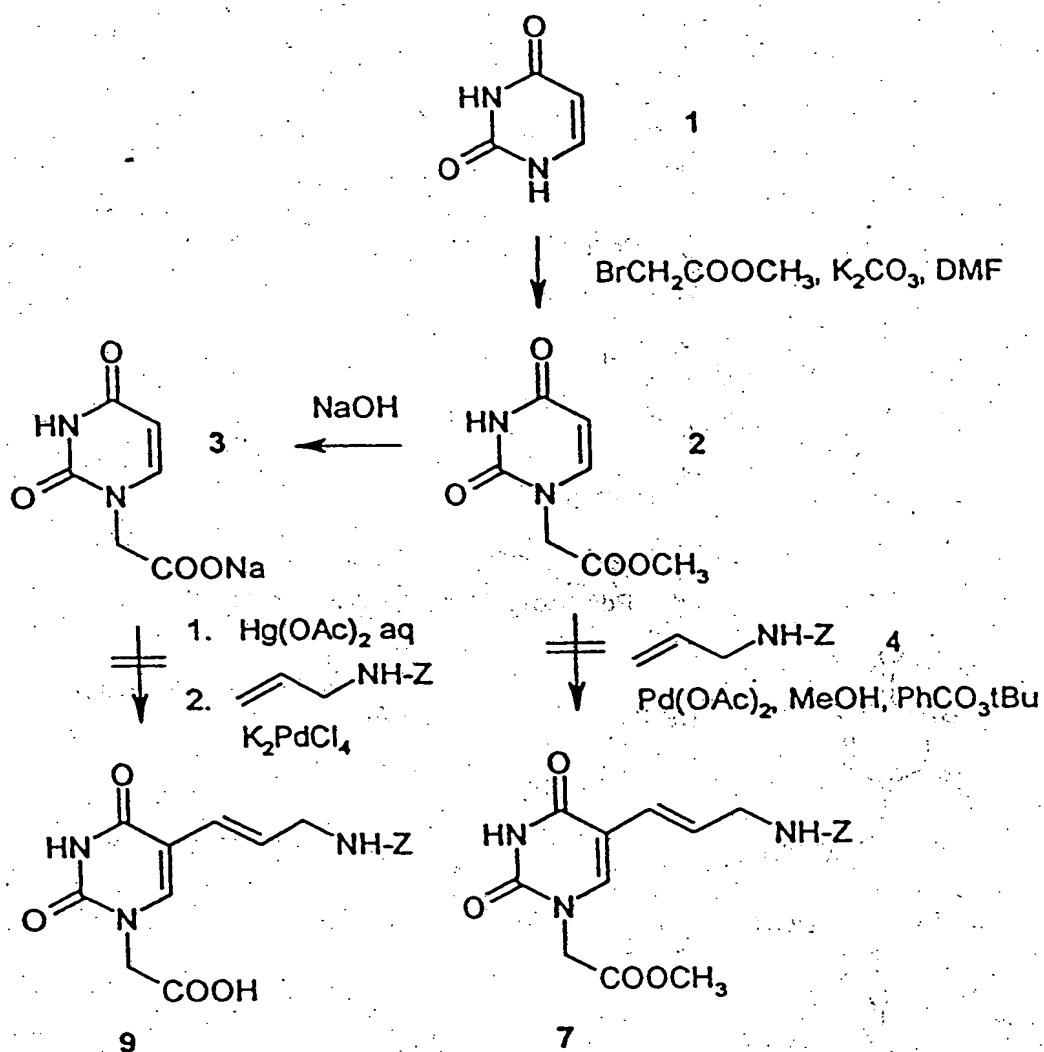


Fig. 1

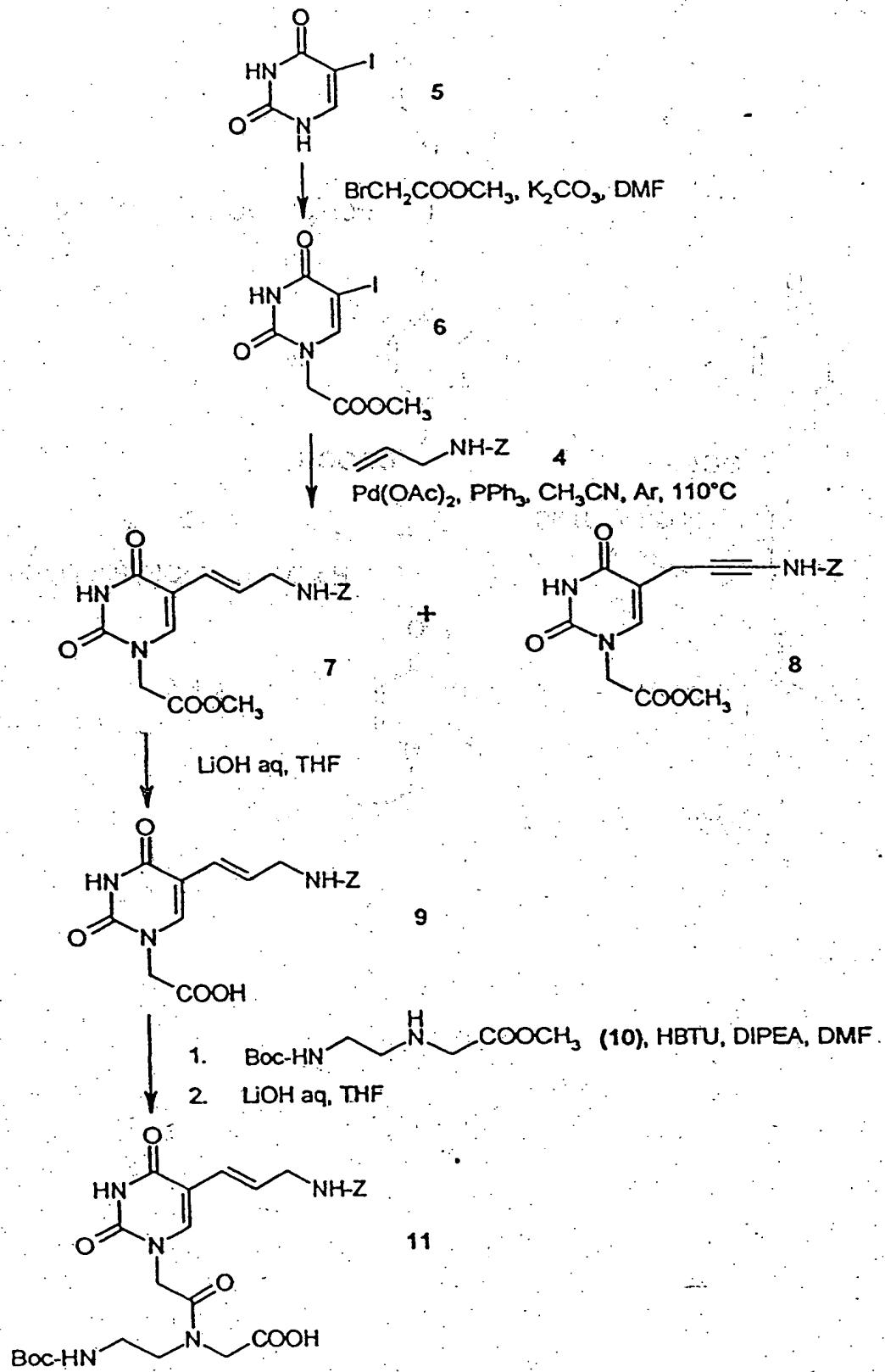


Fig. 2

## D-Lys-Thymin-PNA-Monomer

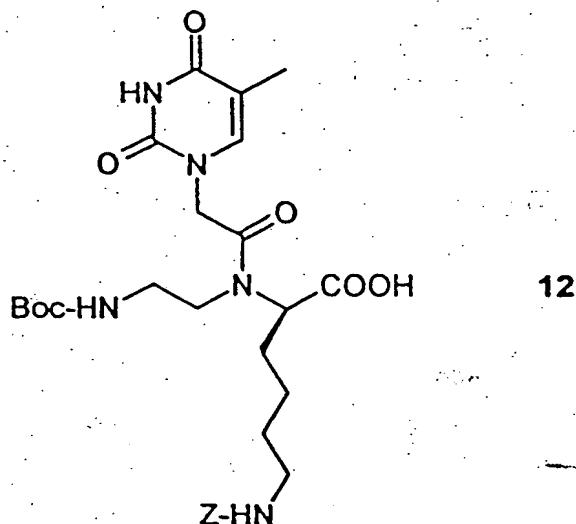
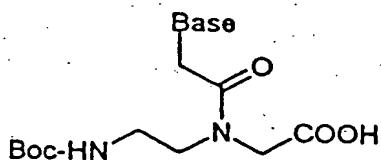


Fig. 3

**PNA-Monomere**

Base = N<sup>8</sup>-Z-Ade, N<sup>2</sup>-Z-Gua, N<sup>4</sup>-Z-Cyt, Thy

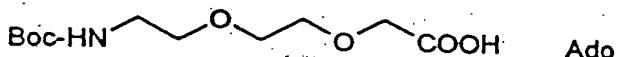
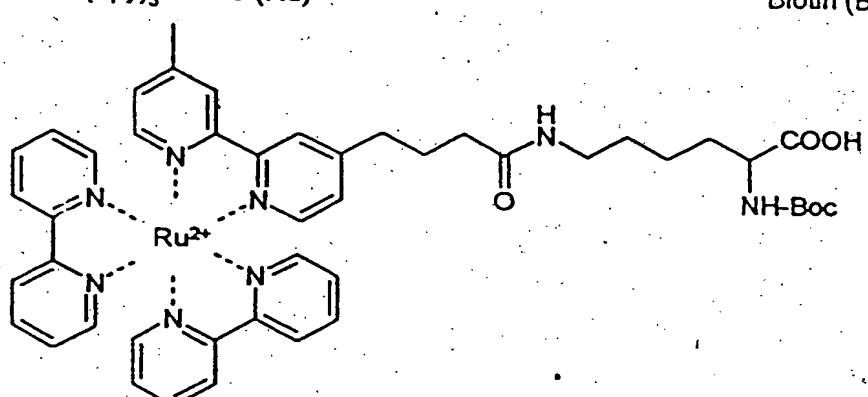
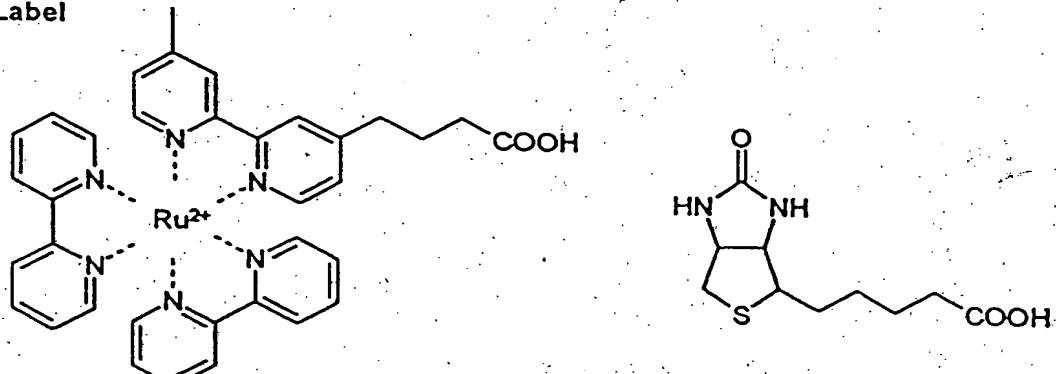
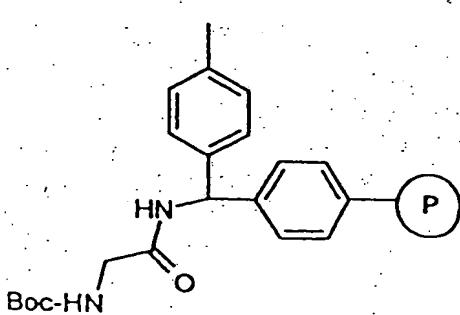
**Linker****Label****Resin**

Fig. 4

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 98/01723

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
 IPC 6 C07K14/00 C07K5/062 A61K38/16 G01N33/68

According to International Patent Classification(IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
 IPC 6 C07K A61K G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>WO 96 11205 A (ISIS PHARMACEUTICALS INC ; BUCHARDT DORTE &amp; LF (DK); NIELSEN PETER) 18 April 1996</p> <p>see page 21, line 8 - line 36          see page 24, line 2 - line 12; claims;          example 47</p>	1-4, 13-18, 21,22, 24-27, 32-44
X	<p>GB 2 284 208 A (PNA DIAGNOSTICS AS) 31 May 1995</p> <p>see claims; examples</p>	21,22, 24-27, 32-44

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 August 1998

Date of mailing of the international search report

09/09/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Fuhr, C

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Int. Application No

PCT/EP 98/01723

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DE 44 08 533 A (HOECHST AG) 28 September 1995 see page 3, line 43 - line 49 see page 4, line 1 - page 6, line 21; claims; examples	1,21, 32-44
P,X	EP 0 781 853 A (LILLY CO ELI) 2 July 1997 see claims; examples 1,2	1,21, 32-44
A	WO 95 16202 A (PNA DIAGNOSTICS AS ;ORUM HENRIK (DK); NIELSEN PETER EIGIL (DK); ST) 15 June 1995 see claims; examples	1-44
A	HAIMA, GERALD ET AL: "Peptide nucleic acids (PNAs) containing thymine monomers derived from chiral amino acids: hybridization and solubility properties of D-lysine PNA" ANGEW. CHEM., INT. ED. ENGL. (1996), 35(17), 1939-1941 CODEN: ACIEAY; ISSN: 0570-0833, 20 September 1996, XP002075301 cited in the application see page 1941, left-hand column, last paragraph - right-hand column, paragraph 1	21,32-44

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/EP 98/01723

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Observation: Although Claim 42 relates to a method for treatment of the human/animal body, the search was carried out and was based on the cited effects of the compound/composition.

2.  Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3.  Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 98/01723

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9611205 A	18-04-1996	AU 3999495 A EP 0804456 A JP 10503524 T	02-05-1996 05-11-1997 31-03-1998
GB 2284208 A	31-05-1995	AT 169632 T AU 684118 B AU 1107595 A CA 2176745 A WO 9514708 A EP 0730602 A JP 9504050 T ZA 9409317 A	15-08-1998 04-12-1997 13-06-1995 01-06-1995 01-06-1995 11-09-1996 22-04-1997 24-05-1996
DE 4408533 A	28-09-1995	AU 683714 B AU 1480095 A CA 2144473 A EP 0672701 A FI 951129 A JP 7291909 A NO 950958 A	20-11-1997 21-09-1995 15-09-1995 20-09-1995 15-09-1995 07-11-1995 15-09-1995
EP 0781853 A	02-07-1997	CA 2190430 A	13-06-1997
WO 9516202 A	15-06-1995	GB 2289677 A AT 165448 T AU 678877 B AU 1272895 A CA 2177604 A DE 69409830 D EP 0733206 A ES 2116718 T JP 9506358 T ZA 9409642 A	29-11-1995 15-05-1998 12-06-1997 27-06-1995 15-06-1995 28-05-1998 25-09-1996 16-07-1998 24-06-1997 05-06-1996

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/01723

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES				
IPK 6	C07K14/00	C07K5/062	A61K38/16	G01N33/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

**B. RECHERCHIERTE GEBIETE**

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole )  
IPK 6 C07K A61K G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

**C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN**

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung; soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 96 11205 A (ISIS PHARMACEUTICALS INC ; BUCHARDT DORTE & LF (DK); NIELSEN PETER) 18. April 1996  siehe Seite 21, Zeile 8 - Zeile 36 siehe Seite 24, Zeile 2 - Zeile 12; Ansprüche; Beispiel 47	1-4, 13-18, 21,22, 24-27, 32-44
X	GB 2 284 208 A (PNA DIAGNOSTICS AS) 31. Mai 1995  siehe Ansprüche; Beispiele ---	21,22, 24-27, 32-44
		-/-



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"V" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindenscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"W" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindenscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist

"\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

24. August 1998

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

09/09/1998

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818, Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Fuhr, C

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/01723

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DE 44 08 533 A (HOECHST AG) 28. September 1995 siehe Seite 3, Zeile 43 – Zeile 49 siehe Seite 4, Zeile 1 – Seite 6, Zeile 21; Ansprüche; Beispiele ---	1,21, 32-44
P,X	EP 0 781 853 A (LILLY CO ELI) 2. Juli 1997 siehe Ansprüche; Beispiele 1,2 ---	1,21, 32-44
A	WO 95 16202 A (PNA DIAGNOSTICS AS ;ORUM HENRIK (DK); NIELSEN PETER EIGIL (DK); ST) 15. Juni 1995 siehe Ansprüche; Beispiele ---	1-44
A	HAAIMA, GERALD ET AL: "Peptide nucleic acids (PNAs) containing thymine monomers derived from chiral amino acids: hybridization and solubility properties of D-lysine PNA". ANGEW. CHEM., INT. ED. ENGL. (1996), 35(17), 1939-1941 CODEN: ACIEAY; ISSN: 0570-0833, 20. September 1996, XP002075301 in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 1941, linke Spalte, letzter Absatz – rechte Spalte, Absatz 1 ---	21,32-44

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/01723

**Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 1 auf Blatt 1)****Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:**

1.  Ansprüche Nr.  
weil Sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich  
**Bemerkung: Obwohl der Anspruch 42**  
**sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen**  
**Körpers bezieht, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich**  
**auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.**
2.  Ansprüche Nr.  
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen,  
daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3.  Ansprüche Nr.  
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

**Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)****Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:**

1.  Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.
2.  Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Internationale Recherchenbehörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3.  Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4.  Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

**Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs**

Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.

Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/01723

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9611205 A	18-04-1996	AU	3999495 A	02-05-1996
		EP	0804456 A	05-11-1997
		JP	10503524 T	31-03-1998
GB 2284208 A	31-05-1995	AT	169632 T	15-08-1998
		AU	684118 B	04-12-1997
		AU	1107595 A	13-06-1995
		CA	2176745 A	01-06-1995
		WO	9514708 A	01-06-1995
		EP	0730602 A	11-09-1996
		JP	9504050 T	22-04-1997
		ZA	9409317 A	24-05-1996
DE 4408533 A	28-09-1995	AU	683714 B	20-11-1997
		AU	1480095 A	21-09-1995
		CA	2144473 A	15-09-1995
		EP	0672701 A	20-09-1995
		FI	951129 A	15-09-1995
		JP	7291909 A	07-11-1995
		NO	950958 A	15-09-1995
EP 0781853 A	02-07-1997	CA	2190430 A	13-06-1997
WO 9516202 A	15-06-1995	GB	2289677 A	29-11-1995
		AT	165448 T	15-05-1998
		AU	678877 B	12-06-1997
		AU	1272895 A	27-06-1995
		CA	2177604 A	15-06-1995
		DE	69409830 D	28-05-1998
		EP	0733206 A	25-09-1996
		ES	2116718 T	16-07-1998
		JP	9506358 T	24-06-1997
		ZA	9409642 A	05-06-1996